

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :

C07D 239/54, 473/34, C07K 7/06, A61K  
47/42, 47/48

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/15509

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum:

1. April 1999 (01.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06002

(22) Internationales Anmeldedatum: 21. September 1998  
(21.09.98)(30) Prioritätsdaten:  
197 41 739.6 22. September 1997 (22.09.97) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVENTIS  
RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG  
[DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).

(72) Erfinder; und

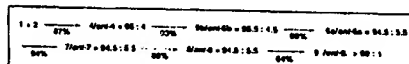
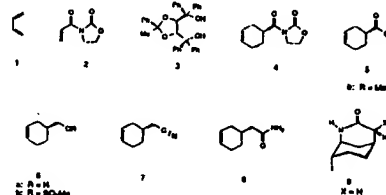
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MICULKA, Christian  
[AT/DE]; Gebeschusstrasse 36, D-65929 Frankfurt am  
Main (DE). WINDHAB, Norbert [DE/DE]; Akazienstrasse  
28, D-65759 Hattersheim (DE). ESCHENMOSE, Al-  
bert [CH/CH]; Bergstrasse 9, CH-8700 Küsnacht (CH).  
SCHERER, Stefan [DE/DE]; Lerchenweg 5, D-64572  
Büttelborn (DE). QUINKERT, Gerhard [DE/DE]; Schauins-  
land 32, D-61479 Glashütten (DE).(74) Anwälte: BARDEHLE, Heinz usw.; Galileiplatz 1, D-81679  
München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, KR, US, europäisches  
Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.(54) Title: CYCLOHEXYL AND HETEROCYCLYL NUCLEOSIDE DERIVATIVES, METHOD FOR PRODUCING THESE DERIVA-  
TIVES, AND THE USE OF THE DERIVATIVES AND THEIR OLIGOMERS OR CONJUGATES IN PAIRING AND/OR  
TESTING SYSTEMS(54) Bezeichnung: CYCLOHEXYL- UND HETEROCYCLYL-NUKLEOSID DERIVATE, DIE HERSTELLUNG UND VERWEN-  
DUNG DIESER DERIVATE, DEREN OLIGOMERE BZW. KONJUGATE IN PAARUNGS- UND/ODER TEST-  
SYSTEMEN

(57) Abstract

The invention relates to a compound of formula (I), wherein  $R^1$  is  $NR^3R^4$ ,  $OR^3$  or  $SR^3$  with  $R^3$  and  $R^4$  being H or  $C_nH_{2n+1}$  independently of each other and being the same or different, n being a whole number from 1 to 12;  $R^2$  is equal to  $C_mH_{2m}-C(X)-Y$  with X being =O, =S or =N, Y being equal to  $OR^3$ ,  $NR^3R^4$  or  $SR^3$ ,  $R^3$  and  $R^4$  having the same meaning given above, and m being a whole number from 1 to 4; or  $R^2$  is equal to  $C_mH_{2m}-Z-Y'$  with Z being a sulfonyl, phosphonyl, ether or amine group,  $Y'$  being equal to H,  $C_nH_{2n+1}$ ,  $OR^3$ ,  $NR^3R^4$  or  $SR^3$  then Z is sulphonyl or phosphonyl group, n,  $R^3$  and  $R^4$  having the meaning given above, and  $Y'$  being equal to  $C_nH_{2n+1}$  when Z is an ether or an amine group; A, B, and D are the same or different and mean  $CR^5R^6$ , O,  $NR^7$  or S independently of each other with  $R^5$ ,  $R^6$  and  $R^7$  being H or  $C_nH_{2n+1}$ , independently of each other, n having the meaning given above; and C is equal to  $CR^8$  or N with  $R^8$  having the meaning of  $R^5$  independently, A-B, B-C or C-D not being two identical heteroatoms; and nucleobase means thymine, uracile, adenine, cytosine, guanine, isocytosine, isoguanine, xanthine or hypoxanthine. The invention also relates to a method for producing these derivatives and to their use in pairing and/or testing systems.



### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Verbindung der Formel (I), worin  $R^1$  gleich  $NR^3R^4$ ,  $OR^3$  oder  $SR^3$  ist mit  $R^3$  und  $R^4$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, H oder  $C_nH_{2n+1}$ , wobei n gleich eine ganze Zahl von 1-12 ist;  $R^2$  gleich  $C_mH_{2m}-C(X)-Y$  mit X gleich =O, =S oder =N ist; Y gleich  $OR^3$ ,  $NR^3R^4$  oder  $SR^3$  ist, wobei  $R^3$  und  $R^4$  die oben genannte Bedeutung haben; und m eine ganze Zahl von 1-4, oder  $R^2$  gleich  $C_mH_{2m}-Z-Y'$  ist mit Z gleich eine Sulfonyl-, Phosphonyl-, Ether- oder Amin-Gruppe, wobei, wenn Z gleich eine Sulfonyl-, oder Phosphonyl-Gruppe,  $Y'$  gleich H,  $C_nH_{2n+1}$ ,  $OR^3$ ,  $NR^3R^4$  oder  $SR^3$  ist, wobei n,  $R^3$  und  $R^4$  die oben genannte Bedeutung haben, und, wenn Z gleich eine Ether- oder Amin-Gruppe,  $Y'$  gleich  $C_nH_{2n+1}$  ist; A, B und D unabhängig voneinander, gleich oder verschieden,  $CR^5R^6$ , O,  $NR^7$  oder S bedeuten mit  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  unabhängig voneinander H oder  $C_nH_{2n+1}$ , wobei n die oben genannte Bedeutung hat und C gleich  $CR^8$  oder N bedeutet mit  $R^8$  unabhängig davon die Bedeutung von  $R^5$ , wobei jedoch A-B, B-C oder C-D nicht zwei gleiche Heteroatome bedeuten; und Nucleobase Thymin, Uracil, Adenin, Cytosin, Guanin, Isocytosin, Isoguanin, Xanthin oder Hypoxanthin bedeutet; ihre Herstellung und Verwendung in Paarungs- und/oder Testsystemen.

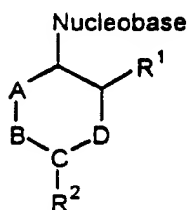
### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

- 5 CYCLOHEXYL- UND HETEROCYCLYL-NUKLEOSID DERIVATE, DIE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG DIESER DERIVATE, DEREN OLIGOMERE BZW. KONJUGATE IN PAARUNGS- UND/ODER TESTSYSTEMEN

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Verbindung der Formel I



- 10 (I),

ihre Herstellung und Verwendung in Paarungs- und/oder Testsystemen.

- 15 Paarungssysteme sind supramolekulare Systeme nicht kovalenter Wechselwirkung, die sich durch Selektivität, Stabilität und Reversibilität auszeichnen, und deren Eigenschaften bevorzugt thermodynamisch, d. h. durch Temperatur, pH-Wert und Konzentration beeinflusst werden. DNA und RNA spielen dabei als Träger der Erbanlagen eine fundamentale Rolle. Solche Paarungssysteme können z. B. aufgrund ihrer selektiven Eigenschaften aber auch als „molekularer Klebstoff“ für die Zusammenführung von unterschiedlichen Metallclustern zu Cluster-Verbänden mit potentiell neuen Eigenschaften verwendet werden [R. L. Letsinger, et al., Nature, 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., Nature, 1996, 382, 609-11).

- 25 Starke und thermodynamisch kontrollierbare Paarungssysteme spielen daher eine immer wichtigere Rolle für die Anwendung im Bereich der Nanotechnologie, zur Herstellung neuer Materialien, Diagnostika, Therapeutika sowie mikroelektronischer, photonischer und optoelektronischer Bauteile und für das kontrollierte Zusammenführen molekularer Species zu supramolekularen Einheiten, wie z. B. den (kombinatorischen) Aufbau von Proteinasssemblies [siehe z. B. A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. DeGrado, Biomoleküls (Pept. Sci.) 1997, 40, 495-504].

Zur Herstellung derartiger Paarungssysteme besitzen DNA- bzw. RNA-Bausteine jedoch folgende Nachteile:

- 5 a) Die Kräfte, die zwei Stränge zusammenhalten, vor allem Wasserstoffbrücken und Stapeleffekte, sind naturgemäß sehr gering. Solche Duplices weisen daher eine geringe Stabilität auf. Dies kann durch Aufnahme einer sog. Umwandlungskurve und Ermittlung des Umwandlungspunktes leicht festgestellt werden. Folglich sind für die Herstellung von Paarungssystemen relativ lange Einzelstränge notwendig, was zur Folge hat, daß der Anteil  
10 des Paarungssystems an der supramolekularen Einheit überwiegt, d. h. die „Nucleotidlast“ ist hoch.
- b) Durch die Ausbildung von *Hoogsteen*-Paarungen, die alternativ zu *Watson-Crick*-Paarungen möglich sind, nimmt die Selektivität ab. Damit sind oftmals parallele Duplices oder irreversible Paarungsvorgänge verbunden.
- 15 c) Durch die hohe Flexibilität des Zucker-Phosphat-Rückgrates bilden sich helicale Konformationen, wodurch die räumliche Anordnung in supramolekularen Einheiten weniger gut gesteuert werden kann.
- d) Die chemische Instabilität der Phosphodiesterbindung im Rückgrat läßt nur eine geringe Varianz an physikalischen Bedingungen, wie pH oder Temperatur, für die Verwendung der  
20 supramolekularen Einheiten zu.
- e) Die Nuclease-Empfindlichkeit der Produkte führt zu einem nur schwer vermeidbaren, raschen enzymatischen Abbau und damit zur Zerstörung der supramolekularen Einheit.
- f) Eine mögliche Interferenz mit dem genetischen Material biologischer Systeme ist nicht auszuschließen, falls die supramolekularen Einheiten in einem biologischen System zum  
25 Einsatz kommen, d. h. eine Orthogonalität des Paarungsvorganges fehlt.
- g) Die Herstellung größerer Mengen an Oligonucleotiden ist aufgrund der geringen Beladbarkeit der üblicherweise verwendeten Festphase beispielsweise im Vergleich zur Peptidsynthese schwierig.
- h) Die Herstellung der nicht-natürlichen L-enantiomeren Form ist durch die schlechte  
30 Zugänglichkeit der entsprechend konfigurierten Zuckerbausteine erschwert.

Damit ist eine Verwendung von DNA- bzw. RNA-Bausteinen z. B. in komplementär gebundenen zwei- und dreidimensionalen supramolekularen Strukturen (siehe z. B.

WO96/13522) in einem physiologischen Medium vor allem im Hinblick auf die Punkte e), f) und g) nur schwer zu realisieren.

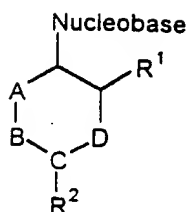
Eine Alternative zu DNA- bzw. RNA-Bausteinen ist die sogenannte Pyranosyl-RNA (p-RNA).  
5 pRNA ist ein Oligonucleotid, das anstelle der Ribofuranose der RNA die Ribopyranose als Zuckerbaustein enthält und daher ausschließlich *Watson-Crick*-gepaarte, antiparallele, reversibel „schmelzende“, *quasi*-lineare und stabile Duplices ausbildet. Daneben gibt es auch homochirale p-RNA-Stränge entgegengesetzten Chiralitätssinns, die ebenfalls kontrollierbar paaren und in der gebildeten Duplex nicht streng-helical sind. Diese für den Aufbau  
10 supramolekularer Einheiten wertvolle Spezifität hängt mit der relativ geringen Flexibilität des Ribopyranosephosphat-Rückgrats sowie mit der starken Neigung der Basenebene zur Strangachse und der hieraus folgenden Tendenz zu intercatenarer Basenstapelung im resultierenden Duplex zusammen und läßt sich letztlich auf die Teilnahme eines 2',4'-cis-disubstituierten Ribopyranoserings am Aufbau des Rückgrates zurückführen. p-RNA löst  
15 damit einige der beschriebenen Nachteile von DNA und RNA, jedoch nicht die Nachteile gemäß Punkt d), e), g) und h).

Eine weitere Alternative stellt die Verknüpfung der Monomereinheiten über Amidbindungen, d. h. der Aufbau eines oligomeren Peptids, sogenannten Peptide Nucleic Acids (PNA's), dar.

20 PNA's weisen durch ihre offenkettige Struktur eine hohe Flexibilität auf und sind damit hinsichtlich ihrer konformationellen Präorganisation für den kontrollierten Aufbau supramolekularer Systeme nicht geeignet.

25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Verbindungen bereit zu stellen, die die oben beschriebenen Nachteile nicht aufweisen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Verbindungen der Formel I



(I)

worin  $R^1$  gleich  $NR^3R^4$ ,  $OR^3$  oder  $SR^3$  ist mit  $R^3$  und  $R^4$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, H oder  $C_nH_{2n+1}$ , wobei n eine ganze Zahl von 1-12, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4 ist; vorzugsweise  $R^1$  gleich  $NR^3R^4$  oder  $OR^3$ , insbesondere  $NR^3R^4$ , vor allem  $NH_2$  bedeutet;

$R^2$  gleich  $C_mH_{2m}-C(X)-Y$  ist mit X gleich  $=O$ ,  $=S$  oder  $=N$ ; Y gleich  $OR^3$ ,  $NR^3R^4$  oder  $SR^3$ , wobei  $R^3$  und  $R^4$  die oben genannte Bedeutung haben; und m eine ganze Zahl von 1-4, insbesondere 1-3, vor allem 1-2; vorzugsweise ist X gleich  $NR^3R^4$  oder  $OR^3$ , insbesondere  $NR^3R^4$ , vor allem  $NH_2$ , und Y ist vorzugsweise gleich  $OR^3$  oder  $NR^3R^4$ ; oder

$R^2$  gleich  $C_mH_{2m}-Z-Y'$  ist mit Z gleich eine Sulfonyl-, Phosphonyl-, Ether- oder Amin-Gruppe, wobei, wenn Z gleich eine Sulfonyl- oder Phosphonyl-Gruppe,  $Y'$  gleich H,  $C_nH_{2n+1}$ ,  $OR^3$ ,  $NR^3R^4$  oder  $SR^3$  ist, wobei n,  $R^3$  und  $R^4$  die oben genannte Bedeutung haben, und, wenn Z gleich eine Ether- oder Amin-Gruppe,  $Y'$  gleich  $C_nH_{2n+1}$ , ist;

A, B und D unabhängig voneinander, gleich oder verschieden,  $CR^5R^6$ , O,  $NR^7$  oder S bedeuten mit  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  unabhängig voneinander H oder  $C_nH_{2n+1}$ , wobei n die oben genannte Bedeutung hat; und

C gleich  $CR^8$  oder N bedeutet mit  $R^8$  unabhängig davon die Bedeutung von  $R^5$ , wobei jedoch A-B, B-C oder C-D nicht zwei gleiche Heteroatome bedeuten; und

der Begriff Nucleobase im Sinne der vorliegenden Erfindung Thymin, Uracil, Adenin, Cytosin, Guanin, Isocytosin, Isoguanin, Xanthin oder Hypoxanthin, vorzugsweise Thymin, Uracil, Adenin, Cytosin oder Guanin bedeutet.

Insbesondere sind Verbindungen bevorzugt, bei denen  $R^1$  gleich  $NH_2$  und  $R^2$  gleich  $CH_2-COOH$  ist, vor allem eine [2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-Nucleobase, wie 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-thymin, 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-uracil, 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-cytosin, 9-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-adenin oder 9-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-guanin.

Weiterhin ist es vorteilhaft, wenn die erfindungsgemäße Verbindung enantiomerenrein ist.

Für die Synthese ist es ferner vorteilhaft, wenn  $R^1$  auch mit Schutzgruppen versehen ist, wie z.  
5 B. im Falle von  $R^1$  gleich  $NH_2$  mit tert.-Butoxycarbonyl-Gruppen (BOC) oder 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppen (Fmoc) oder im Falle von  $R^1$  gleich OH mit Ether- oder Acetalschutzgruppen. Unter Schutzgruppen versteht man im allgemeinen Reste, die reaktive Gruppen von Verbindungen vor unerwünschten Reaktionen schützen und leicht abspaltbar sind. Derartige Gruppen sind z. B. Benzyloxymethyl- (BOM-), BOC-, Fmoc-, Ether- oder  
10 Acetalschutzgruppen.

Daneben kann Y auch mit Aktivierungsreagentien zu reaktiven Intermediaten, z. B. gemischten Anhydriden, umgesetzt sein.

15 Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen Verbindungen Cyclohexanderivate, die in 1'-Stellung eine Nucleobase und in 2'-Stellung ein Nucleophil, wie z. B. ein Stickstoffatom tragen, das mit der reaktiven Gruppe in 4'-Stellung bzw. nach deren Aktivierung, wie z. B. miteinander Carbonylfunktion in Reaktion gebracht werden kann, und somit durch Wiederholung dieses Vorgangs in der Lage ist, eine oligomere Struktur aufzubauen. Aus stereochemischer  
20 Sicht sind Derivate bevorzugt, bei denen alle Substituenten am Sechsring äquatoriale Positionen aufweisen, insbesondere bei denen die Substituenten in 1'- und 2'-Stellung äquatoriale Positionen aufweisen und vor allem bei denen die Nucleobase eine äquatoriale Position aufweist.

25 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können beispielsweise folgendermaßen hergestellt werden.

Am Anfang wird eine chirogene Diels-Alder-Reaktion zwischen z. B. 1,3-Butadien 1 und z. B. 3-(2-Propenoyl)-1,3-oxazolidin-2-on 2 in Gegenwart chiraler, nicht racemischer Promotoren wie  
30 das Seebach'sche TADDOL 3 (D. Seebach et al., J. Org. Chem. 1995, 60, 1788) durchgeführt (siehe Fig. 1). 3-(2-Propenoyl)-1,3-oxazolidin-2-on kann beispielsweise durch Umsetzen von Oxazolidin-2-on mit Acrylsäurechlorid in Gegenwart von Kupfer und Kupfer(I)chlorid hergestellt werden. Die Verbindung 5 kann beispielsweise aus 4 in Anwesenheit von Magnesiumspänen und wasserfreiem Methanol hergestellt werden. Das Reaktionsprodukt

wird anschließend z. B. mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert, um die Verbindung 6 zu ergeben. Das Acetoniril 7 kann aus 6 z. B. durch Umsetzen mit Methansäurechlorid zum Methansäuremethylester und anschließend durch Umsetzen mit Cyanid hergestellt werden. Eine alkalische Hydrolyse des Reaktionsproduktes ergibt das Essigsäurederivat, welches mit  
5 SOCl<sub>2</sub> zum Acetylchlorid umgesetzt werden kann, um in Anwesenheit von einer wäßrigen Ammoniaklösung das Acetamid 8 zu ergeben. Anschließend erfolgt dessen Jodlactamisierung (S. Knapp et al., Org. Synth. 1991, 70, 101), zum Jodlactam 9.

Anschließend kann das Jodlactam 9 in Anwesenheit eines Hydrids an eine Nucleobase  
10 gekoppelt werden, ohne daß der Bicyclus zerstört wird.

Hierzu ist es vorteilhaft, wenn eventuell reaktive Gruppen der Nucleobase durch geeignete Schutzgruppen, z. B. BOC, FMOC, Acetal usw. geschützt werden. Lediglich beim Diaminopurin als Nucleobase sind Schutzgruppen nicht nötig. Jedoch hat sich gezeigt, daß bei  
15 Diaminopurin als Nucleobase der Lactamring nicht mehr geöffnet werden konnte. Unabhängig davon spielt Diaminopurin in biologischen Systemen keine Rolle.

Weiterhin ist es bevorzugt, wenn das Jodlactam nicht in der racemischen Form, sondern enantiomerenrein vorliegt, da die aufzubauenden Oligomeren, die ein Paarungssystem  
20 darstellen sollen, nur einer stereochemischen Reihe angehören sollen. Der Aufbau eines Paarungssystems aus racemischen Bausteinen ist im allgemeinen nicht möglich.

Gemäß der vorliegenden Erfindung kann ein kopplungsfähiger Pyrimidinbaustein, z. B. ein Thyminbaustein, ausgehend vom Iodlactam 9 in einer fünfstufigen Synthesequenz in einer  
25 Ausbeute von 27 % über alle Schritte hergestellt werden (Fig. 2.):

Im ersten Schritt erfolgt die stereoselektive Einführung der Nucleobase in einer Substitutionsreaktion (13a) gefolgt von der Maskierung des aciden Imidprotons des Thymins (13b). Anschließend wird das Lactam durch Einführen einer Schutzgruppe, z. B. der Boc-Gruppe (13c), aktiviert und der Ring nucleophil z. B. mittels LiOOH (14a) geöffnet. Nach  
30 Entfernen der beispielsweise vorhandenen BOM-Schutzgruppe ergibt sich mittels katalytischer Hydrierung der gewünschte Baustein (14b).



Der enantiomorphe (R)-Baustein ent-14b ist durch analoges Vorgehen aus dem (R)-Iodlactam ent-9 erhältlich. Ebenso sind in analoger Weise kopplungsfähige Uracil-, Cytosin- und Isocytosin-Bausteine erhältlich.

- 5 Ein kopplungsfähiger Purinbaustein, z. B. ein Adeninbaustein, ist ausgehend vom Iodlactam 9 in einer siebenstufigen Synthesequenz in einer Ausbeute von 19 % über alle Schritte zugänglich (Fig. 3.):

- 10 Nach Einführung des z. B. N(6)-benzoylierten Adenins in das (S)-Iodlactam 9 unter Retention (15a) erfolgt die Umschätzung zum z. B. N(6)-Formamidinadeninlactam 15c. Anschließend erfolgt die Aktivierung des Lactams z. B. mittels tert-Butoxycarbonylierung (15d), ein erneutes Umschützen zum z. B. N(6)-anisoylgeschützten Lactam (15f) und nachfolgende Lactamspaltung z. B. mittels LiOH liefert den gewünschten Baustein 16.

- 15 Der enantiomorphe (R)-Baustein ent-16 ist durch analoges Vorgehen aus dem (R)-Iodlactam ent-9 erhältlich. Ebenso sind in analoger Weise kopplungsfähige Guanin-, Isoguanin-, Xanthin-, und Hypoxanthin-Bausteine erhältlich.

- 20 Die Herstellung von Heteroatom-enhaltenden Sechsringen sowie anderen Derivaten der erfindungsgemäßen Verbindung sind z. B. analog über eine Hetero-Diels-Alder-Reaktion bzw. über Diels-Alder-Reaktionen mit den entsprechenden Ausgangsverbindungen möglich.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Verbindung mit folgenden Schritten:

- 25 (a) Kopplung des entsprechenden Jodcycloalkans, z. B. eines Jodlactams, vorzugsweise eines enantiomerenreinen Jodcycloalkans mit einer geschützten Nucleobase vorzugsweise in Anwesenheit eines Hydrids, wie z. B. NaH, und im Falle eines Jodlactams  
(b) Aktivierung des Lactams, beispielsweise durch Einführen einer Schutzgruppe wie z. B. eine BOC-Gruppe, sowie  
30 (c) nucleophile Ringöffnung, z. B. durch ein Hydroperoxid wie z. B. LiOOH.

Zur Herstellung von Oligomeren werden die erfindungsgemäßen Verbindungen dann vorzugsweise an fester Phase nach Art der Merrifield-Peptidsynthese zu oligomeren Strukturen aufgebaut. Dabei werden die notwendigen Reagenzien vorzugsweise im Überschuß zugesetzt

und nicht umgesetzte Mengen durch einfache Waschschrirte wieder entfernt [R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 1963, 85, 2149]. Repetitive Zyklen, die aus Abspaltungen der temporären Schutzgruppen und Kupplungen, z. B. nach der Methode des symmetrischen Anhydrids, der geschützten Monomer-Bausteine bestehen, führen zum Oligomeren am Harz. Am Ende der  
5 Synthese wird die terminale Schutzgruppe abgespalten, das Oligomer vom Harz gespalten und bevorzugt mit chromatographischen Methoden aufgereinigt. Die isolierten HPLC-Fraktionen der Syntheseprodukte wurden mit analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft und mit Elektrospray-Massenspektrometrie eindeutig charakterisiert.

- 10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Oligomer, CNA (Cyclohexylnucleooligoamid) genannt, enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung, welche im allgemeinen 2'-->4' verknüpft sind.

Um molekulare Species, wie Peptide, Proteine, Rezeptoren, Redoxzentren, Antikörper,  
15 Nucleinsäure-Abschnitte (wie DNA, RNA) mit Hilfe des beschriebenen Paarungssystem zusammenzuführen, werden im allgemeinen geeignete Linker integriert. Bevorzugt, aber nicht ausschließlich, läßt sich Lysin an jeder beliebigen Stelle im oligomeren Paarungssystem, ganz bevorzugt aber terminal, einbauen. Lysin hat durch seine freie Aminogruppe eine Vielzahl von Verknüpfungsmöglichkeiten. Der Einbau in das erfindungsgemäße Oligomer erfolgt  
20 beispielsweise über Boc-Lysin(Fmoc), dessen FMOC-Gruppe mit Piperidin in DMF abgespalten werden kann.

Daher bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf Oligomere, die zusätzlich mindestens einen Linker, vorzugsweise einen Lysinlinker, vor allem einen terminalen Lysinlinker enthalten.  
25

Das beispielsweise aminofunktionalisierte Oligomere kann auch bevorzugt mit aktivierten Linkern wie z. B. Jodacetylsuccinimid (A) oder Bis(hydroxysuccinimidyl)glutarat (B) derivatisiert werden, welche dann bevorzugt in physiologischen Medien, insbesondere in wäßrig-gepufferten Lösungen ggf. unter Zugabe von organischen Lösungsvermittlern, mit HS-  
30 Gruppen der molekularen Spezies, z. B. über (A) mit den Cystein-Resten eines Peptids oder Proteins oder über (B) mit Aminogruppen der molekularen Spezies unter Bildung von chemisch stabilen, kovalenten Bindungen reagieren.

Daher umfaßt die vorliegende Erfindung auch Oligomere, die mit einem aktivierten Linker, wie z. B. Jodacetylsuccinimid und/oder Bis(hydroxysuccinimidyl)glutarat derivatisiert sind.

Die erfindungsgemäßen Oligomere mit freiem N- und C-Terminus sind bei pH 7 im  
5 allgemeinen nur schlecht in Wasser löslich. Bei Tetrameren werden Konzentrationen im 100 µmolaren, bei Pentameren im 10 µmolaren und bei Hexameren nur noch etwa im 1 µmolaren Bereich erreicht. Dies sind Richtwerte, die je nach Sequenz auch um eine Größenordnung über oder unterschritten werden können. Die Löslichkeit für AAATT liegt beispielsweise bei 1 µM, die für AATAT bei 50 µM.

10

Durch Acylierung des N-Terminus mit einem Hydroxycarbonsäurederivat läßt sich beispielsweise eine Hydroxyfunktion einführen, die phosphoryliert werden kann. Das so erhaltene phosphatierte Oligomere weist bei ca. pH 7 in Wasser üblicherweise eine mindestens ca. 1000-fach erhöhte Löslichkeit auf. Der Nachweis der Löslichkeit erfolgt im allgemeinen  
15 durch UV-Spektroskopie. Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auch auf phosphatierte Oligomere.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist auch ein Konjugat aus einem erfindungsgemäßen Oligomer und einem Biomolekül.

20

Unter Biomolekül versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung z. B. ein Peptid, Peptoid oder Protein, wie z. B. einen Rezeptor, einen Antikörper oder funktionelle Teile davon oder ein Enzym, sowie eine Nucleinsäure wie DNA oder RNA, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, Viroide, und  
25 deren Derivate wie z. B. Acetate.

Funktionelle Teile von Antikörper sind beispielsweise Fv-Fragmente (Skerra & Plückthun (1988) Science 240, 1038), einzelkettige Fv-Fragmente (scFv; Bird et al (1988), Science 242, 423; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879) oder Fab-Fragmente  
30 (Better et al. (1988) Science 240, 1041). Die erfindungsgemäßen Konjugate aus Effektormolekülen und bevorzugt peptidischen, aber im Gegensatz zu PNA selektiven und kontrollierbaren Paarungssystemen sind dann vorteilhaft, wenn reversibel supramolekulare *assemblies* aufgebaut werden sollen, deren Wirkung, wie z. B. Bindung, Inhibition, Auslösung

eines physiologischen Effektes, sich von der Wirkung der einzelnen Effektormoleküle unterscheidet.

So beschreibt z. B. WO 96/13613 eine Methode zum Auffinden einer Substanz, die eine biologische Wirkung durch die Multimerisierung von Proteinen auslöst, indem man zuerst eine Substanz I durch einen Test ermittelt, die an ein Protein bindet, dann eine zweite Substanz II ermittelt, die an ein zweites Protein bindet und dann die beiden Substanzen I und II kovalent über einen Linker verbindet, so daß eine Dimerisierung der beiden Proteine ausgelöst wird. Diese Dimerisierung führt dann den gewünschten biologischen Effekt herbei. Größere Flexibilität kann eine solche Methode erhalten, wenn das Verbinden der beiden Substanzen I und II nicht kovalent, sondern durch ein Paarungssystem wie das erfindungsgemäße Oligomer oder Konjugat erfolgt. Durch die Steuerbarkeit dieser Paarung, beispielsweise durch Temperatur oder pH, kann der Dimerisierungsvorgang der Proteine beobachtet oder dessen Ausmaß gesteuert werden. Die erfindungsgemäßen Paarungssysteme haben z. B. gegenüber den Systemen aus WO 96/13522 den Vorteil, daß sie Nuclease-stabil sind.

Ein Ansatz, peptidische „Klebe“-Einheiten zur Bildung von homo- oder heterodimeren *assemblies* zu verwenden, wird z. B. in WO 94/28173 beschrieben:

Assoziierungspeptide (Hexa- oder Heptapeptide) einer festgelegten Sequenz führen Effektoreinheiten, wie z. B. Proteine, zu supramolekularen Einheiten zusammen. Höhere Flexibilität kann eine solchen Methode durch Steuerbarkeit dieses Assoziierungsvorganges erhalten, die im allgemeinen mit den Assoziierungspeptiden nicht realisiert werden kann, in vorteilhafter Weise jedoch mit den Paarungssystemen der vorliegenden Erfindung.

Daher bezieht sich die Erfindung auch auf die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung, des erfindungsgemäßen Oligomers bzw. des erfindungsgemäßen Konjugates in einem Paarungs- und/oder Testsystem, wie z. B. in WO94/28173, WO96/13522, WO96/13613, R. L. Letsinger, et al., Nature, 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., Nature, 1996, 382, 609-11 oder A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. DeGrado, Biomoleküls (Pept. Sci.) 1997, 40, 495-504 näher beschrieben und oben allgemein erläutert.

Eine besondere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt ein Träger dar, an den eine erfindungsgemäße Verbindung, ein erfindungsgemäßes Oligomer und/oder ein

erfindungsgemäßes Konjugat immobilisiert ist, insbesondere zur Verwendung in einem Paarungs- und/oder Testsystem, wie oben näher beschrieben.

Unter dem Begriff „immobilisiert“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung die Ausbildung einer kovalenten Bindung, quasi-kovalenten Bindung oder supramolekularen Bindung durch Assoziation von zwei oder mehreren molekularen Spezies wie linear konstituierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nukleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclen, insbesondere Stickstoffheterocyclen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente.

Als Trägermaterialien eignen sich beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente wie Cellulose, Gerüstproteine.

Zusammenfassend weist die vorliegende Erfindung gegenüber herkömmlichen Paarungs- und Testsystemen folgende Vorteile auf:

Die Duplices der erfindungsgemäßen Oligomere oder Konjugate sind wesentlich stabiler als jene der DNA, RNA und p-RNA. Die oligomeren Substanzen sind chemisch und gegenüber enzymatischem Abbau im wesentlichen stabil, paaren nicht mit DNA oder RNA und lassen sich auf einfache Weise in größeren Mengen herstellen. Beide Enantiomere sind durch synthetische chirogene Schritte leicht zugänglich. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind daher als selektive „molekulare Klebstoffe“ den bisher bekannten Paarungssystemen überlegen.

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

## BESCHREIBUNG DER FIGUREN

Fig. 1 zeigt schematisch die Synthese des Jodlactams 9.

5

Fig. 2 zeigt schematisch die Synthese eines kopplungsfähigen Thyminbausteins.

Fig. 3 zeigt schematisch die Synthese eines kopplungsfähigen Adeninbausteins.

10 Fig. 4 zeigt die Abbildung einer reversiblen UV-Umwandlungskurve des Oligomers ATATA.

Fig. 5 zeigt die Umwandlungskurve von phosphatiertem Hba-AATAT.

## BEISPIELE

Beispiel 1*Synthese eines kopplungsfähigen Thyminbausteins***Herstellung von 1-[(S, S, S)-8-Azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-3-  
[(benzyloxy)methyl]thymin (13b)****1. Durchführung**

In einem trocknen, mit Schutzgas begasten 50-ml-Löwenthalkolben wurden 148 mg (4.00 mmol) 65%ige NaH-Suspension vorgelegt, zweimal mit je 5 ml wasserfreiem Pentan gewaschen und in 20 ml DMF suspendiert. Es wurden zuerst portionsweise 493 mg (2.00 mmol) 3-(Benzyloxy)methylthymin und nach Abklingen der Gasentwicklung 530 mg (2.00 mmol) 9 zugesetzt. Nach ca. 20 minütigem Rühren bei Raumtemp. bildete sich eine fahlgelbe Reaktionslösung, die über Nacht bei Raumtemp. gerührt wurde.

Man versetzte mit 1 ml einer ges. wäßrigen NH<sub>4</sub>Cl-Lösung und überführte die Reaktionslösung unter Nachspülen mit MeOH in einen Rundkolben. Im Anschluß entfernte man die Lösungsmittel zunächst vorsichtig i.V.i.RV, danach durch Kugelrohrdestillation (70°C/0.5 Torr). Man erhielt 1.71 g eines gelborangefarbenen Öles, welches durch MPL-Chromatographie an 150 g Kieselgel 60 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30:1) gereinigt wurde. Der so erhaltene Feststoff wurde mit wenig Et<sub>2</sub>O digeriert, abfiltriert, zerkleinert und im ÖPV getrocknet. Dies lieferte 405 mg (53%) **13b** (*ent*-**13b**: 50%; *rac*-**13b**: 51%) als farbloses Pulver vom Schmp. 160-162°C. Eine analytische Probe wurde durch Kristallisation aus THF/Cyclohexan erhalten.

**2. Analytische Daten**

*1-[(S, S, S)-8-Azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-3-[(benzyloxy)methyl]thymin (13b):*

**Schmp.:** 160-162°C (THF/Cyclohexan); *ent*-**13b**: 161-162°C.  
*rac*-**13b**: 186-188°C (THF/Cyclohexan).

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1, *R<sub>f</sub>* 0.41.

**Spez. Drehung:**  $[\alpha]_{589}^{20} = -43.3^{\circ}$  (c = 1.10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); *ent*-**13b**:  $[\alpha]_{589}^{20} = +42.9^{\circ}$  (c = 1.05, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

UV (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\max}$  274.2 (9623).

IR (KBr): 3447w, 3189w, 3090w, 2949m, 2906m, 1703s, 1652s, 1464s, 1405s, 1357s, 1270s, 1076s.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 1.59 (m, 3H, H-C(4'), 2H-C(9')); 1.85 (m, H-C(3')); 1.88 (s, CH<sub>3</sub>); 2.00-2.14 (m, 3H, H'-C(3'), H'-C(4'), H-C(6')); 2.20 (br. s, H-C(5')); 2.47 (dd, J(H'-C(6'), H-C(6')) = 18.5, J(H'-C(6'), H-C(5')) = 7.5, H'-C(6')); 3.58 (br. m, H-C(1')); 4.22 (br. m, H-C(2')); 4.60 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>O); 5.35 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>N); 7.22-7.35 (m, 5H, Ph); 7.54 (s m. Fs., H-C(6)); 7.99 (d, J(H-N(8'), H-C(1')) = 4.6, H-N(8')).

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY-Spektrums.

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 12.75 (CH<sub>3</sub>); 17.90 (C(3')); 23.82 (C(9')); 24.66 (C(5')); 27.47 (C(4')); 37.15 (C(6')); 47.27 (C(1')); 55.55 (C(2')); 70.45 (OCH<sub>2</sub>N); 71.06 (PhCH<sub>2</sub>O); 107.82 (C(5)); 127.06, 127.29, 128.03 (5C, Ph); 137.40 (C(6)); 138.18 (C<sub>ipso</sub>); 151.04 (C(2)); 162.67 (C(4)); 170.83 (C(7')).

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-COSY-Spektrums.

MS (ESI<sup>+</sup>): 767.8 [2M+H], 384.5 [M+H].

Anal.: ber. für C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (383.45): C 65.78, H 6.57, N 10.96;  
gef.: C 65.68, H 6.64, N 10.84.

### Herstellung von 1-[(S, S, S)-8-Aza-8-(tert-butoxycarbonyl)-bicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl)-3-[(benzyloxy)methyl]thymin (13c)

#### 1. Durchführung

In einem 250-ml-Rundkolben wurden 7.18 g (18.7 mmol) **13b** in 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und nacheinander mit 2.59 ml (18.7 mmol, 1eq.) NEt<sub>3</sub> und 8.00 ml (37.4 mmol, 2eq.) Boc<sub>2</sub>O versetzt. Im Anschluß gab man spatelweise 2.28 g (18.7 mmol, 1eq.) DMAP zu und rührte die gelbe Reaktionslösung vier Stunden bei Raumtemp.. Es wurden nochmals nacheinander 3.89 ml (28.1 mmol, 1.5 eq.) NEt<sub>3</sub>, 12.0 ml (56.1 mmol, 3 eq.) Boc<sub>2</sub>O und 3.43 g (28.1 mmol, 1.5 eq.) DMAP zugegeben. Nach Rühren über Nacht unter Wasserausschluß waren laut DC-Kontrolle (Kieselgel 60; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1) immer noch Spuren Edukt vorhanden. Daher wurden im Abstand von vier Stunden nochmals je 2.00 ml (9.35 mmol) Boc<sub>2</sub>O zugesetzt. Man



ließ erneut über Nacht unter Wasserausschluß rühren und entfernte im Anschluß die Lösungsmittel und Reagenzien i.V.i.R.V. Dies lieferte 19.5 g eines schmierigen, gelben Feststoffes, den man an 275 g Kieselgel 60 (AcOEt/*n*-Heptan 2:1) chromatographierte. Man erhielt 8.50 g eines leicht gelb gefärbten Feststoffes. Umkristallisation aus 50 ml THF und 100 ml Cyclohexan lieferte 7.81 g (86%) **13c** (*ent*-**13c**: 87%; *rac*-**13c**: 85%) als farblose, kleine Kristalle vom Schmp. 124-126°C.

## 2. Analytische Daten

*1-[(S, S, S)- 8-Aza- 8-(tert-butoxycarbonyl)bicyclo[3.3.1]nonan- 7-on- 2-yl)-3-[(benzyloxy)methyl]thymine (18):*

**Schmp.:** 124-126°C (THF/Cyclohexan); *ent*-**13c**: 123-125°C.

*rac*-**13c**: 125-127°C (THF/Cyclohexan).

**DC:** AcOEt/*n*-Heptan 2:1, *R<sub>f</sub>* 0.13.

**Spez. Drehung:**  $[\alpha]_{589}^{20} = -10.3^{\circ}$  (*c* = 1.37, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); *ent*-**13c**:  $[\alpha]_{589}^{20} = +10.6^{\circ}$  (*c* = 1.20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**UV** (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\max}$  273.6 (10200).

**IR** (KBr): 3447w, 2934w, 1744s, 1701m, 1663s, 1448m, 1363m, 1260s, 1153m, 1078m.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.49 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1.52-1.63, 1.74-2.13 (2m, 6H, 2H-C(3'), 2H-C(4'), 2H-C(9')); 1.88 (s, CH<sub>3</sub>-C(5)); 2.33 (br. s, H-C(5')); 2.38 (d, *J*(H-C(6'), H'-C(6')) = 18.2, H-C(6')); 2.70 (dd, *J*(H'-C(6'), H-C(6')) = 18.2, *J*(H'-C(6'), H-C(5')) = 6.7, H'-C(6')); 4.27 (m, H-C(1')); 4.40 (m, H-C(2')); 4.65 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>O); 5.45 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>N); 7.14-7.32 (m, 6H, H-C(6), Ph).

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY-Spektrums.

**<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 13.39 (CH<sub>3</sub>-C(5)); 19.63 (C(3')); 24.90 (C(9')); 25.37 (C(5')); 27.39 (C(4')); 27.84 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 41.03 (C(6')); 53.36 (C(1')); 57.71 (C(2')); 70.80 (OCH<sub>2</sub>N); 72.25 (PhCH<sub>2</sub>O); 89.97 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 109.73 (C(5)); 127.55, 128.20 (5C, Ph); 137.17 (C(6)); 138.16 (C<sub>ipso</sub>); 151.19, 152.15 (O<sub>2</sub>CN, C(2)); 163.30 (C(4)); 170.45 (C(7')).

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-COSY-Spektrums.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): 501.7 [M+H], 384.5 [M+H-Boc].

**Anal.:** ber. für C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (483.56): C 64.58, H 6.88, N 8.69;

gef.:

C 64.45, H 6.91, N 8.59.

5       **Herstellung von 3-[(Benzyloxy)methyl]-1-[(S, S, S)-2-(tert-butoxycarbonyl)amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]thymine (14a)**

1. Durchführung

10   In einem 500-ml-Rundkolben wurden 7.81 g (16.2 mmol) **13c** in 225 ml THF gelöst, mit 50 ml Wasser versetzt und mittels Eisbad auf 0°C abgekühlt. Es wurden 7.33 g (64.8 mmol) 30%iges Wasserstoffperoxid gefolgt von 25 ml einer wäßrigen Lösung von 1.36 g (32.3 mmol) LiOH-Monohydrat zugegeben, woraufhin sich die Lösung trübte. Das Eisbad wurde entfernt und der Reaktionsansatz 45 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 25 ml einer 1.5M  
15   wäßrigen Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung und 75 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Im Anschluß wurde das THF i.V.i.RV weitgehend entfernt. Die Lösung wurde auf 350 ml Wasser gegossen und mit wenig 2N Natronlauge auf pH > 12 eingestellt. Die milchige Suspension wurde dreimal mit je 350 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die ver. org. Phasen mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel i.V.i.RV erhielt man 2.00 g verunreinigtes **13b**, das aus 30 ml THF und 60 ml  
20   Cyclohexan umkristallisiert wurde. Es gelang so 1.55 g (25%) **13b** (*ent*-**13b**: 27%; *rac*-**13b**: 30%) wiederzugewinnen.

Die basische, wäßrige Phase wurde vorsichtig mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 1-2 eingestellt und dreimal mit je 350 ml AcOEt extrahiert. Nach Trocknen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Entfernen der Lösungsmittel i.V.i.RV, digerieren mit 50 ml Et<sub>2</sub>O, Filtration und Trocknen im ÖPV  
25   erhielt man 5.09 g (63%) **14a** (*ent*-**14a**: 60%; *rac*-**14a**: 65%) als feinkristallinen Feststoff vom Schmp. 89-91°C.

2. Analytische Daten

30   3- [(Benzyloxy)methyl]- 1-[(S, S, S) -2-(tert-butoxycarbonyl)amino- 4-(carboxymethyl)-cyclohexyl]thymine (**14a**):

Schmp.:       89-91°C (nach Digerieren mit Et<sub>2</sub>O); *ent*-**14a**: 90-92°C.

*rac*-**14a**: 168-170°C (THF/Cyclohexan).

DC:           CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1, R<sub>f</sub> 0.37.

**Spez. Drehung:**  $[\alpha]_{589}^{20} = -24.0^\circ$  ( $c = 0.99$ , MeOH); *ent*-14a:  $[\alpha]_{589}^{20} = +23.9^\circ$  ( $c = 1.05$ , MeOH).

**UV (CH<sub>3</sub>CN):**  $\lambda_{\max}$  273.2 (10890).

**IR (KBr):** 3373 $m$ , 2974 $m$ , 2932 $m$ , 1706 $s$ , 1691 $s$ , 1664 $s$ , 1647 $s$ , 1534 $m$ , 1469 $m$ , 1452 $m$ ,  
1365 $m$ , 1290 $m$ , 1255 $m$ , 1175 $m$ .

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** 0.88-1.30 ( $m$ , 2H, H-C(4) H-C(6)); 1.19 ( $s$ , 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);  
1.66-2.00 ( $m$ , 5H, 2H-C(3), H'-C(4), H-C(5), H'-C(6)); 1.80 ( $s$ , CH<sub>3</sub>-C(5'));  
2.16 ( $m_c$ , 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 3.79 ( $m_c$ , H-C(1)); 4.27 ( $m_c$ , H-C(2)); 4.58 ( $s$ ,  
2H, PhCH<sub>2</sub>O); 5.34 ( $s$ , 2H, OCH<sub>2</sub>N); 6.86 ( $d$ ,  $J$ (H-N, H-C(1)) = 9.6, NH);  
7.23-7.37 ( $m$ , 5H, Ph); 7.68 ( $br. s$ , H-C(6')); 12.09 ( $br. s$ , CH<sub>2</sub>COOH).

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY-Spektrums.

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 13.09 (CH<sub>3</sub>-C(5')); 28.11 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 30.13 (C(3)); 31.07 (C(4));  
33.38 (C(5)); 39.23 (C(6)); 40.18 (CH<sub>2</sub>COOH); 51.38 (C(1)); 58.19 (C(2));  
70.83 (OCH<sub>2</sub>N); 72.17 (PhCH<sub>2</sub>O); 80.05 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 110.06 (C(5')); 127.62,  
127.69, 128.27 (5C, Ph); 135.46 (C(6')); 138.00 (C<sub>ipso</sub>); 152.72, 155.43  
(O<sub>2</sub>CN, C(2')); 163.20 (C(4')); 176.30 (CH<sub>2</sub>COOH).

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-COSY-Spektrums.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 519.7 [M+H+H<sub>2</sub>O].

**Anal.:** ber. für C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (501.58): C 62.26, H 7.03, N 8.38;  
gef.: C 62.00, H 6.96, N 8.17.

## Herstellung von 1-[(*S,S,S*)-2-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]thymine (14b)

### 1. Durchführung

In einem 500-ml-Dreihalskolben wurden 300 mg Pd-C in 60 ml wasserfreiem THF suspendiert und 45 min lang mit Wasserstoff gesättigt. Es wurde im Anschluß eine Lösung von 2.01 g (4.00 mmol) 14a in 30 ml THF zugegeben und die Reaktionsmischung 90 min (DC-Kontrolle; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1) intensiv unter Wasserstoffatmosphäre gerührt.

Der Katalysator wurde über *Celite* abfiltriert und die Lösungsmittel i.V.i.RV entfernt. Man erhielt 1.96 g eines farblosen Schaumes, den man in 90 ml wasserfreiem MeOH löste und mit

454 mg (8.40 mmol) NaOMe versetzte. Es wurde über Nacht unter Wasserausschluß bei Raumtemp. gerührt.

Man versetzte mit 6 ml ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung und entfernte die Lösungsmittel weitgehend i.V.i.RV. Der Rückstand wurde auf 50 ml Wasser gegossen, der pH-Wert der wäßrigen Phase mit 2N Salzsäure auf 1-2 eingestellt und die wäßrige Phase viermal mit je 50 ml AcOEt extrahiert. Nach Trocknen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Entfernen der Lösungsmittel i.V.i.RV digerierte man den erhaltenen Schaum mit 20 ml Et<sub>2</sub>O. Nach Filtration des Präzipitates und Trocknen im ÖPV erhält man 1.43 g (94%) **14b** (*ent*-**14b**: 90%; *rac*-**14b**: 88%) als farblosen Feststoff vom Schmp. 231-233°C. Eine analytische Probe wurde durch Kristallisation aus MeOH/Wasser erhalten.

## 2. Analytische Daten

*1-[(S, S, S)-2-(tert-Butoxycarbonyl)amino]-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]thymin (14b):*

**Schmp.:** 235-237°C (MeOH/ H<sub>2</sub>O); Gasentwicklung; *ent*-**14b**: 234-237°C.

*rac*-**14b**: 231-233°C (MeOH/ H<sub>2</sub>O); Gasentwicklung.u. Zersetz..

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 5:1, *R<sub>f</sub>* 0.38.

**Spez. Drehung:**  $[\alpha]_{589}^{20} = -21.9^{\circ}$  (c = 0.57, MeOH); *ent*-**14b**:  $[\alpha]_{589}^{20} = +21.2^{\circ}$  (c = 0.53, MeOH).

**UV (H<sub>2</sub>O):**  $\lambda_{\max}$  272.4 (11450).

**IR (KBr):** 3374s, 3187w, 2978w, 2935w, 1702s, 1648s, 1522s, 1394w, 1366w, 1282s, 1254m, 1170m.

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** 0.85-1.38 (*m*, 2H, H-C(4) H-C(6)); 1.27 (*s*, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1.62-2.00 (*m*, 5H, 2H-C(3), H'-C(4), H-C(5), H'-C(6)); 1.73 (*s*, CH<sub>3</sub>-C(5')); 2.15 (*m<sub>c</sub>*, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 3.75 (*m<sub>c</sub>*, H-C(1)); 4.19 (*m<sub>c</sub>*, H-C(2)); 6.77 (*d*, *J*(H-N, H-C(1)) = 9.6, NH); 7.56 (*s*, H-C(6')); 11.09 (*s*, H-N(3')); 12.08 (*br s*, CH<sub>2</sub>COOH).

Im Bereich von 6.00-10.0 ppm sind mehrere kleine Signale zu erkennen, die beim Auf-heizen der NMR-Probe auf 80°C verschwinden.

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY-Spektrums.

**<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** 12.03 (CH<sub>3</sub>-C(5')); 27.90 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 29.16 (C(3)); 30.72 (C(4)); 32.72 (C(5)); 38.06 (C(6)); 40.30 (CH<sub>2</sub>COOH); 49.71 (C(1)); 57.05 (C(2)); 77.51 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 107.65 (C(5')); 138.32 (C(6')); 151.28, 154.79 (O<sub>2</sub>CN, C(2')); 163.60 (C(4')); 173.35 (CH<sub>2</sub>COOH).

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY-Spektrums.

MS (ESI<sup>+</sup>): 382.3 [M+H].

Anal.: ber. für  $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6$  (381.43): C 56.68, H 7.13, N 11.02;  
gef.: C 56.45, H 7.16, N 10.80.

5

## Beispiel 2

### *Synthese eines kopplungsfähigen Adeninbausteins*

#### Herstellung von 9-[(S,S,S)-8-Azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-6-N-benzoyl-adenin (15a)

10

#### 1. Durchführung

Ein 500 ml Zweihalsrundkolben wurde mit 180 ml trockenem DMF und 2.25 g einer  
15 Suspension an NaH (60 mmol) beladen. 7.18 g 6-N-Benzoyladenin (30 mmol) wurden  
portionsweise hinzugegeben und die Mischung solange geführt bis die Gasentwicklung  
abklang. Nach 15 min wurden 7.95 g Iodlactam 9 (30 mmol) hinzugegeben und die Lösung im  
Dunklen 22 h lang gerührt. Danach wurde die Lösung auf 0°C abgekühlt und durch Zugabe  
von 1 M wäßriger HCl (24 ml) neutralisiert. Unter reduziertem Druck (0.3 mbar,  
20 Badtemperatur 60°C) wurde das Lösemittel entfernt. Der resultierende Rest wurde in 100 ml  
MeOH gelöst und auf 15 g Silicagel vorabsorbiert. Eine Chromatographie über 7 x 15 cm  
Silicagel mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (12:1) ergab 17 g eines gelben Öls, welches in 15 ml MeOH  
umkristallisiert wurde, um 8.2 g 15a (22 mmol; 73%) eines farblosen Feststoffes zu ergeben,  
der für weitere Reaktionen rein genug war. Eine analytische Probe wurde durch Kristallisation  
25 aus MeOH/Et<sub>2</sub>O erhalten.

#### 2. Analytische Daten

Schmp.: 269-271°C (Zersetzung)  
30 TLC:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10:1,  $R_f$  0.28  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +35.9° (c 1.03, MeOH)  
UV (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  280 (20329)  
IR: 3500-3000s, 2938m, 1685m, 1654s, 1610s, 1542w, 1508m, 1490m,  
1458s, 1400m, 1341m, 1286s, 1254s, 1168w, 1098m, 799w, 713m, 643w.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 1.53-1.72 (*m*, 3H); 2.08-2.32 (*m*, 5H); 2.48-2.58 (*m*, 1H);  
4.27 (br. *m*, 1H, H-C(1')); 4.63 (br. *m*, 1H, H-C(2')); 7.52-7.58 (*m*, 2H,  
Ph); 7.62-7.68 (*m*, 1H, Ph); 8.04-8.08 (*m*, 2H, Ph); 8.14 (*d*, *J* (H-N(8'),  
H(C(1')) = 4.3 Hz, H-N(8')); 8.70, 8.75 (2 *s*, 2H, H-C(2); H-C-(8));  
11.18 (*s*, 1H, H-NC(6)).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 18.89, 24.21, 27.27 (C(3'), C(4'), C(9')); 25.15 (C(5')); 36.95  
(C(6')); 47.44 (C(1')); 54.21 (C(2')); 125.32 (C(5)); 128.34, 132.28,  
133.34 (Ph); 143.05 (C(8)); 150.17 (C(4)); 151.12 (C(2)); 152.59 (C(6));  
165.49 (Bz-C=O); 171.39 (Lactam-C=O).

MS (ESI<sup>+</sup>): 377 [M+H] (100%)

Mikroanalyse: kalkuliert für C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>: C 63.83, H 5.32, N 22.34  
gefunden: C 63.90, H 5.45, N 22.1

## Herstellung von 9-[(*S,S,S*)-8-Azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-adenin (15b)

### 1. Durchführung

Ein 500 ml Rundhalskolben wurde mit 8.2 g Benzoyl-A-lactam **15a** (22 mmol) und 250 ml trockenem Methanol beladen. Die Suspension wurde erhitzt bis **15a** vollständig aufgelöst war. Danach wurde eine Lösung von 1.62 g NaOMe in 5.5 ml MeOH hinzugegeben und die Mischung 19 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die resultierende Suspension wurde filtriert und das Präzipitat mit Et<sub>2</sub>O gewaschen. Das Filtrat wurde durch Zugabe von Ionenaustauscherharz (Amberlite IR-120, H<sup>+</sup>-Form) neutralisiert. Das Harz wurde abfiltriert und das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 4 ml MeOH gelöst und durch Zugabe von 30 ml Et<sub>2</sub>O ausgefällt. Das Präzipitat wurde gefiltert und die vereinten Präzipitate unter Vakuum getrocknet, um 5.8 g **15b** (21 mmol, 97%) zu ergeben, das rein genug für weitere Reaktionen war. Eine analytische Probe wurde durch Kristallisation aus MeOH/H<sub>2</sub>O erhalten.

### 2. Analytische Daten

Schmp.: 300-302°C (Zersetzung)

TLC:	MeOH, $R_f$ 0.35
$[\alpha]_D^{20}$ :	+42.8° ( $c$ 0.40, MeOH)
UV (MeOH):	$\lambda_{\max}$ 260 (16374)
IR:	3367s, 3179s, 3101m, 2926m, 2864w, 1651s, 1600s, 1563m, 1470m, 1337m, 1296m, 1258m, 1229m, 1166w, 1107w, 1005w, 802w, 724w, 668w.
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $d_6$ -DMSO):	1.48-1.67 ( $m$ , 3H); 2.04-2.24 ( $m$ , 5H); 2.46-2.54 ( $m$ , 1H); 4.20 (br. $m$ , 1H, H-C(1')); 4.46 (br. $m$ , 1H, H-C(2')); 7.26 ( $s$ , 2H, $\text{NH}_2$ ); 8.06 ( $d$ , $J$ (H-N(8'), H-C(1')) = 4.3 Hz, H-N(8')); 8.14, 8.35 (2 $s$ , 2H, H-C(2); H-C-(8)).
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $d_6$ -DMSO):	18.94, 24.15, 27.36 (C(3'), C(4'), C(9')); 25.20 (C(5')); 37.03 (C(6')); 47.47 (C(1')); 53.85 (C(2')); 118.75 (C(5)); 139.18 (C(8)); 149.70 (C(4)); 152.15 (C(2)); 156.03 (C(6)); 178.91 (lactame-C=O).
MS (ESI <sup>+</sup> ):	273 [M+H] (100%)
Mikroanalyse:	kalkuliert für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O} \times \text{H}_2\text{O}$ : C 53.78, H 6.25, N 28.95 gefunden: C 53.65, H 6.24, N 29.12

**Herstellung von 9-[(*S,S,S*)-8-Azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-6-*N*-  
dimethylaminomethylidene-adenin (15c)**

**1. Durchführung**

Ein 500 ml Rundkolben wurde mit 5.58 g A-lactam 15b (20 mmol), 200 ml trockenem DMF und 17.1 ml Dimethylformamiddiethylacetal (100 mmol) beladen. Die Mischung wurde auf 80°C 3h lang erhitzt. Die resultierende klare Lösung wurde unter reduziertem Druck (0.4 mbar, 60°C Badtemperatur) konzentriert, um 6.9 g von rohem 15c zu ergeben, das ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

**2. Analytische Daten**

TLC ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ):  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1,  $R_f$  0.75

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.58-1.79 (*m*, 2H); 1.89-1.93 (*m*, 1H); 2.16-2.28 (*m*, 2H); 2.38-2.51 (*m*, 3H); 2.69-2.78 (*m*, 1H); 3.23, 3.28 (2 *s*, 6H, CH<sub>3</sub>); 4.38 (br. *m*, 1H, H-C(1')); 4.68 (br. *m*, 1H, H-C(2')); 6.62 (*d*, *J* (H-N(8')), H(C(1')) = 4.3 Hz, H-N(8')); 8.13, 8.54 (2 *s*, 2H, H-C(2); H-C-(8)); 8.97 (*s*, 1H, Formamidin-H).

MS (ESI<sup>+</sup>): 328 [M+H] (100%)

Herstellung von 9-[(*S,S,S*)-8-*N-Tert.*-butoxycarbonyl-8-azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-6-*N*-dimethylaminomethylidene-adenin (15d)

1. Durchführung

Ein 250 ml Rundkolben wurde mit 6.9 g rohem Amidine-A-lactame 15c (20 mmol) und 100 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> beladen. Unter Rühren wurden 2.8 ml Triethylamin (20 mmol) hinzugegeben, gefolgt von 8.7 g Boc<sub>2</sub>O (40 mmol) und 2.44 g DMAP (20 mmol). Die Lösung wurde 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt bis das gesamte Ausgangsmaterial verbraucht war. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der resultierende Rückstand wurde mittels Chromatographie (7 x 16 cm Silicagel, Elutionsmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1) gereinigt, um 8.2 g eines gelben Feststoffes zu ergeben, der in einen 100 ml Rundkolben überführt wurde. Danach wurden 50 ml Et<sub>2</sub>O hinzugegeben und die Mischung wurde 2 h lang unter Rückfluß beschallt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung filtriert und das Präzipitat wurde mit Et<sub>2</sub>O behandelt und noch einmal mit Ultraschall beschallt. Die Filtration ergab 6.66 g 15d (78%) eines leicht gelblichen Feststoffes, der rein genug für weitere Reaktionen war.

2. Analytische Daten

TLC: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10:1, *R<sub>f</sub>* 0.66

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.54 (*s*, 9H, *tert.*-Bu); 1.84-2.36 (*m*, 7H); 2.44 (*d*, 1H, *J* = 18.5 Hz); 2.77 (*dd*, *J* = 7.0, 18.5 Hz, 1H); 3.14, 3.20 (2 *s*, 6H, Formamidin-CH<sub>3</sub>); 4.80 (br. *m*, 1H, H-C(1')); 5.23 (br. *m*, 1H, H-C(2')); 8.04, 8.48 (2 *s*, 2H, H-C(2); H-C-(8)); 8.87 (*s*, 1H, Formamidin-H).



MS (ESI<sup>+</sup>): 428 [M+H] (100%)

5 **Herstellung von 9-[(*S,S,S*)-8-*N-Tert.*-butoxycarbonyl-8-azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-adenin (15e)**

**1. Durchführung**

10 Ein 250 ml Rundkolben wurde mit 6.64 g Amidine-A-lactame 15d (15.5 mmol) und 150 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> beladen. Danach wurden 11.55 g of *p*-Toluolsulfonsäurehydrazid (62.0 mmol) hinzugegeben gefolgt von 1.47 g TsOH (7.75 mmol). Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 44 h lang gerührt. Nach der Zugabe von 150 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurde die Lösung dreimal mit Wasser gewaschen und durch Zugabe von 2 M NaOH auf einen pH > 12  
15 eingestellt. Die vereinigten Waschlösungen wurden mit 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach der Filtration wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt und der resultierende Rückstand mittels Chromatographie (5.2 x 20 cm Silicagel, Elutionsmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH 30:1) gereinigt, um 4.96 g 15e (86%) zu ergeben, das für weitere Reaktionen rein genug ist. Eine analytische  
20 Probe wurde durch Kristallisation aus THF/Cyclohexan erhalten.

**2. Analytische Daten**

Schmp.: 211°C (gas evol.) 300-302°C (Zersetzung)  
25 TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH 30:1, *R<sub>f</sub>* 0.23  
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +80.6° (c 1.32, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  
UV (MeCN/H<sub>2</sub>O 1:9): λ<sub>max</sub> 260 (14136)  
IR: 3406m, 3328m, 3206m, 2941w, 1756s, 1724s, 1701m, 1668s, 1645s,  
1597s, 1570m, 1479m, 1414w, 1304m, 1273s, 1251s, 1228m, 1145s,  
30 1034w, 996w, 853w, 760w.  
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.62 (s, 9H, *tert.*-Bu); 1.81-1.89 (m, 3H); 2.19-2.37 (m, 4H);  
2.54 (d, *J* = 18.5 Hz, 1H); 2.86 (dd, *J* = 7.0, 18.5 Hz, 1H); 4.86 (br. m, 1H, H-C(1')); 5.28 (br. m, 1H, H-C(2')); 5.64 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 8.06, 8.38 (2 s, 2H, H-C(2); H-C(8)).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 19.93, 25.45, 27.23 (C(3'), C(4'), C(9')); 25.97 (C(5')); 28.01 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 40.24 (C(6')); 52.65 (C(1')); 53.68 (C(2')); 84.12 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 119.82 (C(5)); 139.20 (C(8)); 150.59 (C(4)); 152.58 (C(2)); 155.55 (C(6)); 158.46 (Boc-C=O); 171.14 (lactame-C=O).

5 MS (ESI<sup>+</sup>): 373 [M+H] (100%)

Mikroanalyse: kalkuliert für C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: C 58.05, H 6.50, N 22.57  
gefunden: C 58.13, H 6.51, N 22.85

10

**Herstellung von 9-[(S,S,S)-8-*N*-*Tert.*-butoxycarbonyl-8-azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-6-*N*-*p*-methoxybenzoyl-adenin (15f)**

**1. Durchführung**

15

Ein 100 ml Zweihalsrundkolben wurde mit 4.96 g Boc-A-lactame 15e (13.3 mmol) und 60 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> beladen. Danach wurden 5.35 ml trockenes Pyridin (66.5 mmol) hinzugegeben, gefolgt von 1.59 g DMAP (1.3 mmol). Nach dem Abkühlen auf 0°C wurden 5.4 ml 4-Methoxybenzoylchlorid (39.9 mmol) tropfenweise hinzugegeben und die Mischung wurde bei 0°C 15 min lang gerührt. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung wurde 22 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung wieder auf 0°C gekühlt und 35 ml MeOH wurden tropfenweise hinzugegeben. Nach 30 min bei 0°C wurden 80 ml einer gesättigten Lösung von NH<sub>3</sub> in MeOH tröpfchenweise hinzugegeben. Es bildete sich ein weißes Präzipitat, das sich nach vollständiger Zugabe der Lösung auflöste. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion bei Raumtemperatur für weitere 2 h gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt und der resultierende Rückstand in 200 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgelöst. Die Lösung wurde nacheinander mit 150 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und wäßriger Zitronensäurelösung (20%, 2 x 100 ml) gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> gewaschen, filtriert und im Vakuum konzentriert. Der resultierende Rückstand wurde mittels Chromatographie (5.2 x 18 cm Silicagel; Elutionsmittel: EtOAc/MeOH 40:3) gereinigt, um 5.93 g 15f (88%) zu ergeben.

20  
25  
30

## 2. Analytische Daten

Schmp.:	110-112°C (Zersetzung)
TLC:	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 40:1, <i>R<sub>f</sub></i> 0.44
5 [α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> :	+58.3° (c 1.32, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )
UV (MeOH):	λ <sub>max</sub> 288 (30459)
IR:	3600-3050m, 2940m, 1757s, 1707m, 1671m, 1604s, 1577m, 1506s, 1458m, 1402m, 1342m, 1251s, 1168m, 1145s, 1100m, 1024m, 893w, 848m, 794w, 761m, 644w.
10 <sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ):	1.63 (s, 9H, <i>tert.</i> -Bu); 1.84-1.91 (m, 3H); 2.24-2.40 (m, 4H); 2.55 (d, <i>J</i> = 18.5 Hz, 1H); 2.88 (dd, <i>J</i> = 7.0, 18.5 Hz, 1H); 3.92 (s, 3H, OMe); 4.95 (br. m, 1H, H-C(1')); 5.28 (br. m, 1H, H-C(2')); 7.01-7.04 (m, 2H, PMBz-H); 8.01-8.04 (m, 2H, PMBz-H); 8.26, 8.81 (2 s, 2H, H- C(2); H-C(8)); 8.91 (s, 1H, H-NC(6)).
15 <sup>13</sup> C-NMR (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ):	19.95, 25.55, 27.24 (C(3'), C(4'), C(9')); 25.95 (C(5')); 28.06 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ); 40.28 (C(6')); 52.61 (C(1')); 53.99 (C(2')); 55.54 (OMe); 84.27 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ); 114.08 (PMBz); 123.12 (C(5)); 126.24 (PMBz); 130.03 (PMBz); 141.58 (C(8)); 149.87 (C(4)); 152.00 (C(2)); 152.31 (C(6)); 152.54, 163.31, 164.02 (PMBz, PMBz-C=O, Boc-C=O); 171.14 (Lactam-C=O).
20 MS (ESI <sup>+</sup> ):	507 [M+H] (100%)
Mikroanalyse:	kalkuliert für C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> : C 61.66, H 5.93, N 16.60 gefunden: C 61.75, H 6.01, N 16.69

Herstellung von 9-[(*S,S,S*)-2-(*Tert.*-butoxycarbonyl)amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-  
6-*N-p*-methoxybenzoyl-adenin (16)

## 1. Durchführung

Ein 500 ml Zweihalsrundkolben wurde mit 5.25 g PMBzBoc-A-lactam **15f** (10.36 mmol) und 200 ml THF beladen. Nach dem Abkühlen auf 0°C, wurde eine Lösung von 2.17 g LiOH x H<sub>2</sub>O (51.8 mmol) in 50 ml H<sub>2</sub>O über einen Zeitraum von 20 min. tropfenweise hinzugegeben.

Danach wurden 30 ml MeOH hinzugegeben, das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung wurde für eine 1h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde ein Ionenaustauscherharz (Amberlite IR-120, H<sup>+</sup>-Form) hinzugegeben bis ein pH von 7 erreicht wurde. Das Harz wurde durch Filtration entfernt und die Lösung wurde unter reduziertem Druck auf ein Volumen von 100 ml konzentriert. Anschließend wurden 200 ml H<sub>2</sub>O hinzugegeben und ein pH von 2 durch Zugabe von 1 M wäßriger HCl eingestellt. Die Lösung wurde mit EtOAc (3 x 200 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Der resultierende Rückstand wurde in 25 ml von heißem MeOH gelöst. Das Produkt wurde anschließend durch Zugabe von 10 ml H<sub>2</sub>O ausgefällt. Das Präzipitat wurde filtriert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> getrocknet, um 1.95 g **16** zu ergeben. Weitere 0.57 g konnten von der Mutterlösung und den Waschlösungen erhalten werden, um eine Gesamtausbeute von 46% zu ergeben.

## 2. Analytische Daten

Schmp.: 238-239°C

TLC: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10:1, R<sub>f</sub> 0.39

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +19.9° (c 0.55, MeOH)

UV (MeCN/H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub> 290 (22722)

IR: 3368m, 2939w, 1710m, 1683s, 1608s, 1577m, 1528m, 1507m, 1458m, 1306m, 1250s, 1175s, 1030w, 842w, 761w.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 1.08 (s, 9H, *tert.*-Bu); 1.09-1.40 (m, 2H); 1.80-2.35 (m, 7H); 3.86 (s, 3H, OMe); 4.07, 4.36 (2 br. m, 2H, H-C(1') H-C(2')); 6.87 (br. s, 1H, NHBoc); 7.06-7.09 (m, 2H, PMBz-H); 8.00-8.05 (m, 2H, PMBz-H); 8.42, 8.86 (2 s, 2H, H-C(2); H-C-(8)); 10.88 (s, 1H, H-NC(6)).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 27.73 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 30.35, 30.46, 37.95 (C(3'), C(5'), C(6')); 32.89 (C(4')); 40.32 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H); 51.30 (C(2')); 55.38 (OMe); 77.45 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 113.55 (PMBz); 125.24 (C(5)); 125.63 (PMBz); 131.41 (PMBz); 143.48 (C(8)); 150.03 (C(4)); 150.69 (C(2)); 152.38 (C(6)); 154.53, 162.38, 164.77 (PMBz, PMBz-C=O, Boc-C=O); 173.36 (CO<sub>2</sub>H).

MS (ESI<sup>+</sup>): 525 [M+H] (100%)

Mikroanalyse: kalkuliert für C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>: C 59.53, H 6.15, N 16.02  
 gefunden: C 59.35, H 6.32, N 15.89

### Beispiel 3

#### *Synthese eines Oligomers mit der Sequenz ATATA*

5

Als polymerer Träger wird ein Polyoxyethylen-(POE)-Polystyrol-Copolymer (Tentagel S HMB, 0,23 mmol/g) verwendet, das sowohl in wäßriger Lösung als auch in organischen Lösungsmitteln gute Quelleigenschaften besitzt. Die Aminoethylfunktionen des Polymers sind mit einem Hydroxymethyl-benzoyl-(HMB)-Linker derivatisiert; die Beladung mit dem ersten A-Baustein erfolgt unter Verwendung eines 5-fachen Überschusses nach der Methode des symmetrischen Anhydrids (Zugabe von 2.5 eq. DIC und 2.5 eq. DMAP) innerhalb von 20 h in DCM.

Es erfolgte schrittweise Verlängerung der Oligomerkette durch repetitive Zyklen, die aus Abspaltungen der temporären Boc-Schutzgruppen und Kupplungen der Boc-geschützten Monomer-Bausteine bestehen. Am Ende der Synthese wird die N-terminale Boc-Schutzgruppe mit 50% TFA/DCM abgespalten, das Oligomer wird mit 2 N HCl/MeOH vom HMB-Linker gespalten und mit HPLC für die weiteren Umwandlungsexperimente aufgereinigt.

Der Standard-Kupplungszyklus ist in der Tabelle beschrieben: die Boc-Schutzgruppe der Aminofunktion wird mit 50% TFA/DCM abgespalten (30 min), anschließend wird das Harz mit DCM gewaschen und mit 1 M DIEA/DMF neutralisiert und mit DMF aminfrei gewaschen. Die Kupplungen erfolgen jeweils nach Voraktivierung des Monomer-Bausteins (3 eq.) mit HATU (3 eq.) in DMF und unter Zusatz von 1 M DIEA/DMF (6 eq.) und 2 M Lutidin/DMF (12 eq.). Die Kupplungszeiten betragen 3 h bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Kupplungszyklen werden nicht-umgesetzte Aminofunktionen mit Essigsäureanhydrid (20 eq.) unter Pyridinzusatz (10 eq.) gecappt. Zur Reaktionskontrolle mittels HPLC wurden nach jedem Kupplungsschritt ein paar Harzkügelchen entnommen, die zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit 50% TFA/DCM behandelt wurden. Dann wurde das jeweilige Oligomer mit 2 N NaOH/MeOH (15 min, RT) abgespalten, die Abspaltungslösung wurde mit HCl neutralisiert und per RP-HPLC analysiert.

Nach Beendigung der Synthese erfolgt die Abspaltung der Boc-entschützten Oligomeren vom HMB-Harz, wie gewohnt, mit 2 N NaOH/MeOH (15 min, RT). Die Abspaltung der *p*-Methoxybenzoyl-Schutzgruppen bei (A<sup>PMBz</sup>)-haltigen Oligomeren wird dadurch erreicht, daß die Abspaltungslösung 2.5 h bei 55 °C gehalten wird. Die Aufreinigung erfolgt nach der

Neutralisation der Abspaltungslösung mit HCl durch RP-HPLC. Die isolierten HPLC-Fractionen der Syntheseprodukte wurden mit analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft, mit Elektrospray(ESI)-Massenspektrometrie eindeutig charakterisiert, und eine reversible UV-Umwandlungskurve bei 265 nm ( $C_{ATATA}=27,9 \mu\text{M}$  in 5 mM Tris/HCl; pH 7,0) aufgenommen (Fig. 4.), womit die Eignung als Paarungssystem bewiesen ist.

**ATATA:**

Mber = 1361,0

(M+H)<sub>gef</sub> = 1362,0

tR = 14,1 min (10 bis 40 % Acetonitril in 0,1 %iger TFA in Wasser in 30 min)

10 Absorptionsmaximum: 263 nm

Tabellarische Übersicht zu den Kupplungen:

Operation	Reagenz/Lsg.mittel	Volumen	Zeit
1. Deblockierung	50% TFA/DCM	150 $\mu\text{l}$	1 x 5 min 1 x 25 min
2. Waschen	DCM	150 $\mu\text{l}$	5 x (im Durchfluß)
3. Neutralisation	1 M DIEA/DMF	75 $\mu\text{l}$	1 x (im Durchfluß)
4. Waschen	DMF	150 $\mu\text{l}$	5 x (im Durchfluß)
5. Kupplung	Baustein/HATU/DMF	80 $\mu\text{l}$	180 min (Schütteln)
	1 M DIEA/DMF	12 $\mu\text{l}$	
	2 M Lutidin/DMF	12 $\mu\text{l}$	
6. Waschen	DMF	150 $\mu\text{l}$	3 x (im Durchfluß)
7. Analytik mit HPLC:	Probeabspaltung mit 2 N NaOH/MeOH (15 min, RT)		
8. Capping	Ac <sub>2</sub> O	10 $\mu\text{l}$	20 min (Schütteln)
	Pyridin	10 $\mu\text{l}$	
	DCM	100 $\mu\text{l}$	
9. Waschen	DCM	150 $\mu\text{l}$	5 x (im Durchfluß)

Beispiel 4*Reversible Bildung eines homodimeren Peptids*

Analog Beispiel 3 wird eine Sequenz AATAT an der Festphase aufgebaut, und an diesen Paarungsabschnitt ein Boc-Lysin(Fmoc)-Baustein gekuppelt. Mit 40 % Piperidin in DMF wird die Fmoc-Gruppe abgespalten, mit DMF gewaschen und dann mit Jodessigsäure (20 eq.) und DIC (20 eq.) in DMF versetzt. Nach 15 h bei RT. wird die Lösung abfiltriert, das Harz mit DMF gewaschen und mit dem Peptid CYSKVG (50 eq.) in DMF versetzt. Man beläßt 15 h bei RT., filtriert die Lösung ab und wäscht das Harz mit DMF und MeOH. Man spaltet mit 2 M NaOH wäßrig mit MeOH (1:1) vom Harz ab und erhitzt die Abspalllösung 2.5 h auf 55 °C. Nach Abkühlen neutralisiert man mit 2 M Salzsäure und isoliert das Produkt mit RP-HPLC (10 bis 40 % Acetonitril in 0,1 %iger TFA in Wasser in 30 min). Die Produktfraktion (V = 3 ml) wird im Vakuum vom Acetonitrilanteil befreit und auf 500 µl wäßrige Lösung eingengt. Diese Lösung wurde über eine SepPak Plus C18-Cartridge (Waters) entsalzt, und auf 1 ml wäßrige Lösung eingestellt. Die Konzentration des Oligomers betrug  $c = 140 \mu\text{mol/l}$  (aus E = 1,004 bei 265 nm, gemessen bei 70 °C).

Die UV-Umwandlungskurve einer 10 µmolaren Lösung zeigte, daß unterhalb der Raumtemperatur die Substanz als einheitliches Homodimer vorliegt, während überhalb von 40 °C kein Homodimer nachgewiesen werden kann. Dieses Gleichgewicht ist reversibel, der Anteil an Homodimer kann durch Wahl der Temperatur und der Konzentration eingestellt werden.

Beispiel 5

## Übersicht der thermodynamischen Daten selbstkomplementärer CNA-Oligomere

Sequenz	Basen- paare	Stacks Purin- Purin	Purin- Pyri- midin	T <sub>m</sub> (1 µm) [°C]	T <sub>m</sub> (10 µm) [°C]	ΔG (298 K) [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [cal/molK]
ATATA	4	3	0	20.9	32.3	-7.52	-36	-95
AATAT	4	2	2	27.4	40.5	-8.47	-33	-82
AAATT	4	1	4	35.0		-9.78	-49	-130
TTAAA	4	0	2	10.0		-6.6 ± 0.5	-33	-90
ATATAT	6	3	0	22.5				
ATAT	4	2	0		≈ -2°	-4.3	-24	-65

### Beispiel 6

Konjugation mit einem definierten Peptid oder einer Peptidbibliothek

- 5 Die Konjugation von definierten Peptiden und Peptidbibliotheken an CNA wurde unter identischen experimentellen Bedingungen durchgeführt. Im folgenden wird die Konjugation der CNA Ac-CNA(AATAT)-Lys-OH (1) mit dem Peptid H-Cys-Ser-Lys-Val-Gly-OH (3) beschrieben.

10 6.1 Iodacetylierung von (1) an der  $\epsilon$ -Aminofunktion von Lysin

- 1 (0,69  $\mu$ mol) wurde in 800  $\mu$ l 0.1 M Bicarbonat-Lösung gelöst und mit 150 Equivalenten Iodessigsäure-N-succinimidylester (102  $\mu$ mol, 28,9 mg) in 400  $\mu$ l Dimethylsulfoxid 2 h unter Lichtausschluß geschüttelt. Das Produkt Ac-CNA(AATAT)-Lys(N<sup>ε</sup>-Iodacetyl)-OH (2) wurde  
15 direkt über präparative RP-HPLC aufgereinigt und über eine RP-C18 Kartusche entsalzt.  
analytische RP-HPLC:  $R_t$  = 17,93 min  
ESI-MS:  $M_r(\text{ber})$  = 1699,7,  $M_r(\text{gef})$  = 1699,4

6.2 Konjugation von 2 mit H-Cys-Ser-Lys-Val-Gly-OH 3

20

- Zur Lösung von 2 (106 nmol) in 20  $\mu$ l Wasser/Dimethylformamid (1:1) wurde eine Lösung von 3 (127 nmol, 83  $\mu$ g, Gehalt ca. 70 %) in 30  $\mu$ l 0,5 M Phosphatpuffer, 20 mM EDTA pH 6.0 gegeben und der Ansatz wurde unter Lichtausschluß geschüttelt. Nach 1 h hatte das Peptid zwar vollständig abreagiert, die CNA war jedoch nur zu ca. 50% umgesetzt. Durch nochmalige  
25 Zugabe derselben Menge an Peptid in Puffer und 1 h Schütteln unter Lichtausschluß wurde 2 vollständig umgesetzt. Das CNA-Peptid Konjugat wurde direkt über RP-HPLC aufgereinigt und über eine RP-C18 Kartusche entsalzt.  
analytische RP-HPLC:  $R_t$  = 16,93 min  
ESI-MS:  $M_r(\text{ber})$  = 2227,6,  $M_r(\text{gef})$  = 2227,4

30

### Beispiel 7

Verbesserung der Löslichkeit durch Phosphatierung

35



## 7.1 Allgemeine Vorschrift zur Phosphatierung von CNA:

### 7.1.1 Kupplung von DMT-geschützter 4-Hydroxybuttersäure (Hba) an AATAT-HMB-Harz

5 100 mg AATAT-HMB-Harz mit einer Belegung von 0,15 mmol/g Harz (0.015 mmol) wurden nach der Abspaltung der letzten Boc-Schutzgruppe in einer 5 ml Kunststoffspritze mit Fritte mit 5 ml 1 M DIPEA-Lösung in DMF neutralisiert und 4 mal mit DMF gewaschen. 0,15 mmol (61 mg) DMT-Hba ( $M = 406,48$ ) und 0,15 mmol (57 mg) HATU ( $M = 380,2$ ) wurden in 2 ml NMP gelöst und geschüttelt. Nach 10 Minuten wurden 0,9 mmol DIPEA (900  $\mu$ l einer 1 M  
10 Lösung in DMF) zugegeben und geschüttelt. Die Kupplungslösung wurde zum Harz gegeben und die Spritze mit dem Harz 4 h um die kurze Spritzenachse gedreht (ca. 0,5 Umdrehungen/s), um für eine gute Durchmischung zu sorgen. Die Lösung wurde aus der Spritze gedrückt und das Harz 4 mal mit 4 ml DMF und 2 mal mit 4 ml DCM gewaschen.

### 15 7.1.2 Detritylierung

Das Harz wurde 5 mal mit 4 ml 6 % DCA in DCM je 2 Minuten detrityliert und 4 mal mit DCM und 3 mal mit trockenem Acetonitril (ACN) nachgewaschen. Das Harz wurde über Nacht im Exsikkator über  $P_2O_5$  getrocknet.

20

### 7.1.3 Phosphitylierung und Oxidation

Das Harz wurde unter Argon mit 2 ml 0,5 M Pyridiniumhydrochlorid in trockenem ACN gequollen. Es wurden 10 eq. (0.15 mmol, 41 mg) Bis-(2-cyanoethyl)-N,N-Diisopropylamino-  
25 Phosphoramidit ( $M = 271,3$ ) zugegeben und 20 Minuten gedreht. Das Harz wurde 4 mal mit 4 mL trockenem ACN gewaschen und mit 0,5 ml einer 6 M t-BuOOH Lösung in Decan und 1 mL ACN 30 Minuten oxidiert. Anschließend wurde 4 mal mit trockenem ACN nachgewaschen.

### 30 7.1.4 Abspaltung der Cyanoethylschutzgruppen

Das Harz wurde mit 4 ml einer 2 M Lösung von DBU in Pyridin versetzt und 15 h gedreht. Danach wurde 6 mal mit ACN gewaschen.

#### 7.1.5 Abspaltung vom Harz und pMBz-Entschützung

5 Mit 2 ml 2M NaOH in Wasser wurde die Substanz innerhalb von 10 Minuten vom Harz gespalten. Es wurde mit weiteren 2 ml Natronlauge nachgewaschen und die resultierende Lösung 3 h auf 55 °C gehalten. Nach Neutralisation mit 2 M HCl wurde die Verbindung an der RP-HPLC gereinigt (Eluent Wasser/Acetonitril mit 0,1 % TFA).

#### 7.1.6

10 Zuletzt wurde die Substanz wie bereits beschrieben an einer SEP PAK Kartusche (RP) entsalzt und bei RT und reduziertem Druck bis zur Trockene eingeeengt.

Massenspektrum von  $\text{H}_2\text{PO}_3\text{-Hba-AATAT}$  ( $M_{\text{exakt}} = 1526,7$ ).

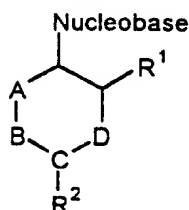
Sichtbar ist das Molekülion mit Na-Clustern einfach und zweifach geladen.

15

Die Umwandlungskurve ist in Fig. 5 dargestellt. Der  $T_m$ -Wert beträgt 45,4 °C. Der  $T_m$ -Wert von AATAT (45  $\mu\text{m}$ ) beträgt zum Vergleich 49,4 °C.

5 Patentansprüche

1. Verbindung der Formel I



(I)

10

worin  $R^1$  gleich  $NR^3R^4$ ,  $OR^3$  oder  $SR^3$  ist mit  $R^3$  und  $R^4$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, H oder  $C_nH_{2n+1}$ , wobei n gleich eine ganze Zahl von 1-12 ist;

$R^2$  gleich  $C_mH_{2m}-C(X)-Y$  mit X gleich =O, =S oder =N ist; Y gleich  $OR^3$ ,  $NR^3R^4$  oder  $SR^3$  ist, wobei  $R^3$  und  $R^4$  die oben genannte Bedeutung haben, vorzugsweise ist X gleich  $NR^3R^4$  und  $OR^3$ , insbesondere  $NR^3R^4$ , vor allem  $NH_2$ ; und m eine ganze Zahl von 1-4, oder

$R^2$  gleich  $C_mH_{2m}-Z-Y'$  ist mit Z gleich eine Sulfonyl-, Phosphonyl-, Ether- oder Amin-Gruppe, wobei, wenn Z gleich eine Sulfonyl- oder Phosphonyl-Gruppe,  $Y'$  gleich H,  $C_nH_{2n+1}$ ,  $OR^3$ ,  $NR^3R^4$  oder  $SR^3$  ist, wobei n,  $R^3$  und  $R^4$  die oben genannte Bedeutung haben, und, wenn Z gleich eine Ether- oder Amin-Gruppe,  $Y'$  gleich  $C_nH_{2n+1}$ , ist;

A, B und D unabhängig voneinander, gleich oder verschieden,  $CR^5R^6$ , O,  $NR^7$  oder S bedeuten mit  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  unabhängig voneinander H oder  $C_nH_{2n+1}$ , wobei n die oben genannte Bedeutung hat; und

C gleich  $CR^8$  oder N bedeutet mit  $R^8$  unabhängig davon die Bedeutung von  $R^5$ , wobei jedoch A-B, B-C oder C-D nicht zwei gleiche Heteroatome bedeuten; und

Nucleobase Thymin, Uracil, Adenin, Cytosin, Guanin, Isocytosin, Isoguanin, Xanthin oder Hypoxanthin bedeutet.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^1$  gleich  $NR^3R^4$  oder  $OR^3$  ist und  $R^2$  gleich  $C_mH_{2m}-C(X)-Y$  mit  $X$  gleich  $NR^3R^4$  oder  $OR^3$  und  $Y$  gleich  $OR^3$  oder  $NR^3R^4$  ist.
3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^1$  gleich  $NH_2$  und  $R^2$  gleich  $CH_2-COOH$  ist.
4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ausgewählt ist aus einer [2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-Nucleobase.
5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß sie ausgewählt ist aus 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-thymine, 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-uracil, 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-cytosine, 9-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-adenine oder 9-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-guanine.
6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung enantiomerenrein ist.
7. Verbindung nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^1$  und/oder die Nucleobase mit Schutzgruppen versehen ist.
8. Verbindung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Schutzgruppen ausgewählt sind aus BOC-, BOM-, FMOC-, Ether- oder Acetalschutzgruppen.
9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleobase äquatorial angeordnet ist.
10. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß ein Jodcycloalkan an eine geschützte Nucleobase gekoppelt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Jodcycloalkan ein Jodlactam ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß in weiteren Schritten das Lactam aus dem vorhergehenden Schritt aktiviert wird, und anschließend der Lactamring nucleophil geöffnet wird.
- 5 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-12, dadurch gekennzeichnet, daß das Jodcycloalkan enantiomerenrein vorliegt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-13, dadurch gekennzeichnet, daß das Jodcycloalkan an eine geschützte Nucleobase in Anwesenheit eines Hydrids gekoppelt  
10 wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-14, dadurch gekennzeichnet, daß das Lactam durch Einführen einer Schutzgruppe aktiviert wird.
- 15 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-15, dadurch gekennzeichnet, daß der Lactamring gemäß Schritt (c) durch ein Hydroperoxid nucleophil geöffnet wird.
17. Oligomer enthaltend eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1-9.
- 20 18. Oligomer nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich mindestens einen Linker enthält.
19. Oligomer nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein Lysin-Linker ist.
- 25 20. Oligomer nach einem der Ansprüche 17-19, dadurch gekennzeichnet, daß es mit einem aktivierten Linker derivatisiert ist.
21. Oligomer nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der aktivierte Linker Jodacetylsuccinimid und/oder Bis(hydroxysuccinimidyl)glutarat ist.
- 30 22. Oligomer nach einem der Ansprüche 17 - 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligomer phosphatiert ist.
23. Konjugat enthaltend ein Oligomer gemäß einem der Ansprüche 17-22 und ein Biomolekül.

24. Konjugat nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Biomolekül ein Peptid, Peptoid, Protein, Zellbestandteil, Filamentbestandteil, oder eine Nucleinsäure, und Derivate davon ist.
- 5
25. Träger, dadurch charakterisiert, daß daran mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1-9, mindestens ein Oligomer gemäß einem der Ansprüche 17-22 und/oder mindestens ein Konjugat gemäß Anspruch 23 oder 24 immobilisiert ist.
- 10
26. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1-9, eines Oligomers gemäß einem der Ansprüche 17-22, eines Konjugates gemäß Anspruch 23 oder 24 und/oder eines Trägers gemäß Anspruch 25 in einem Paarungs- und/oder Testsystem.

1/5

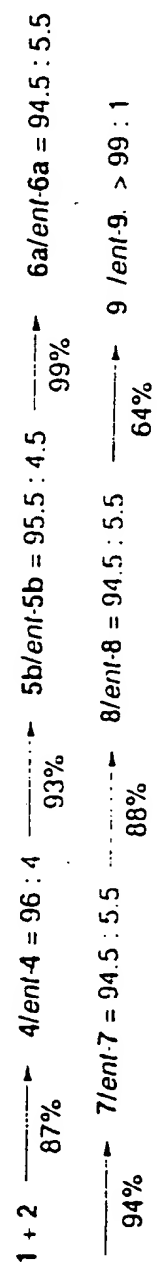
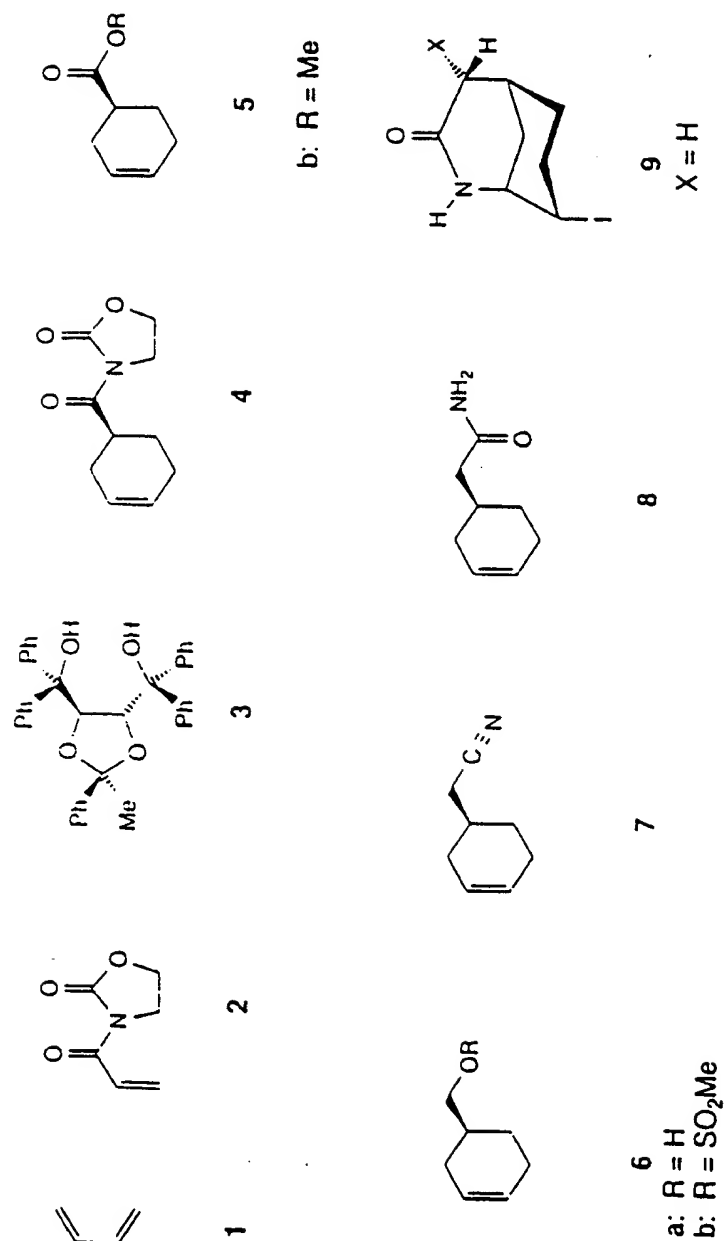


Fig. 1

2/5

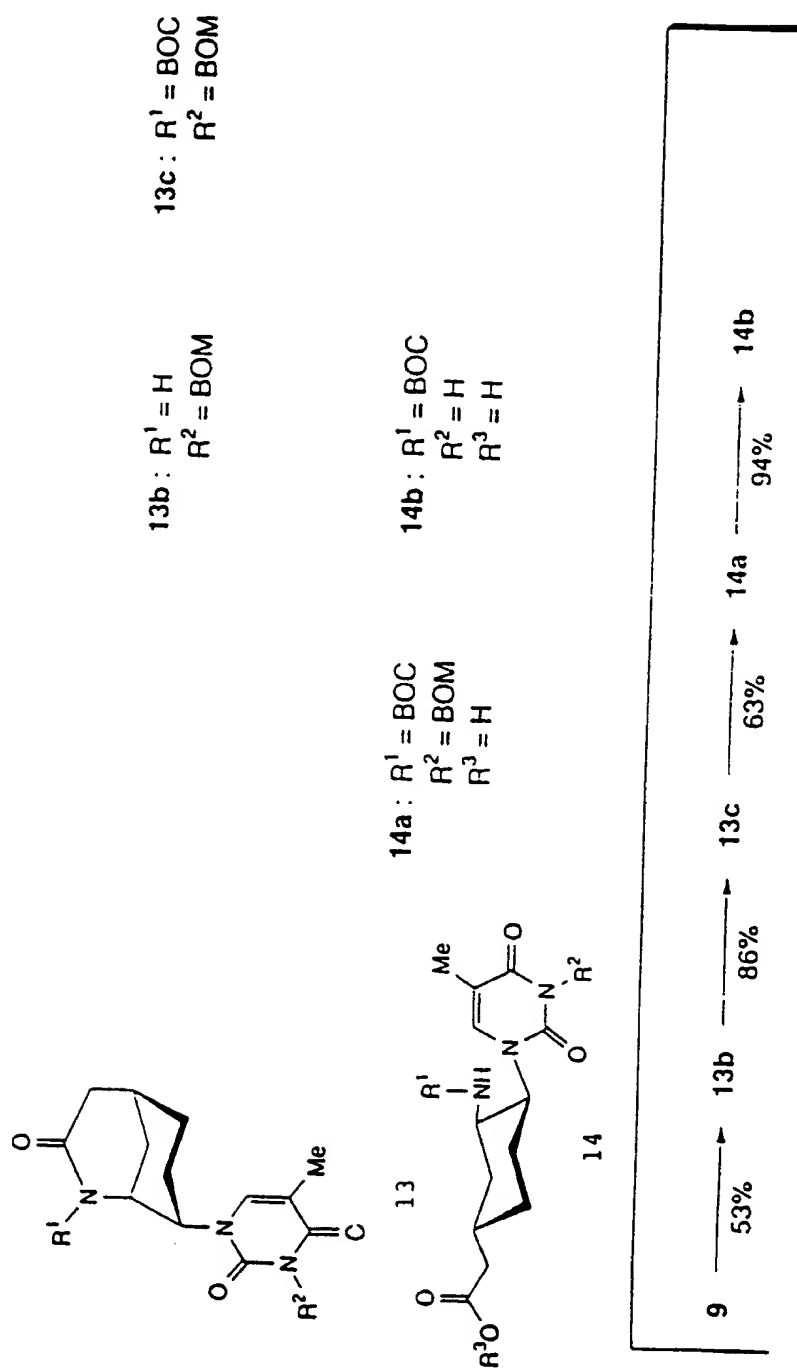
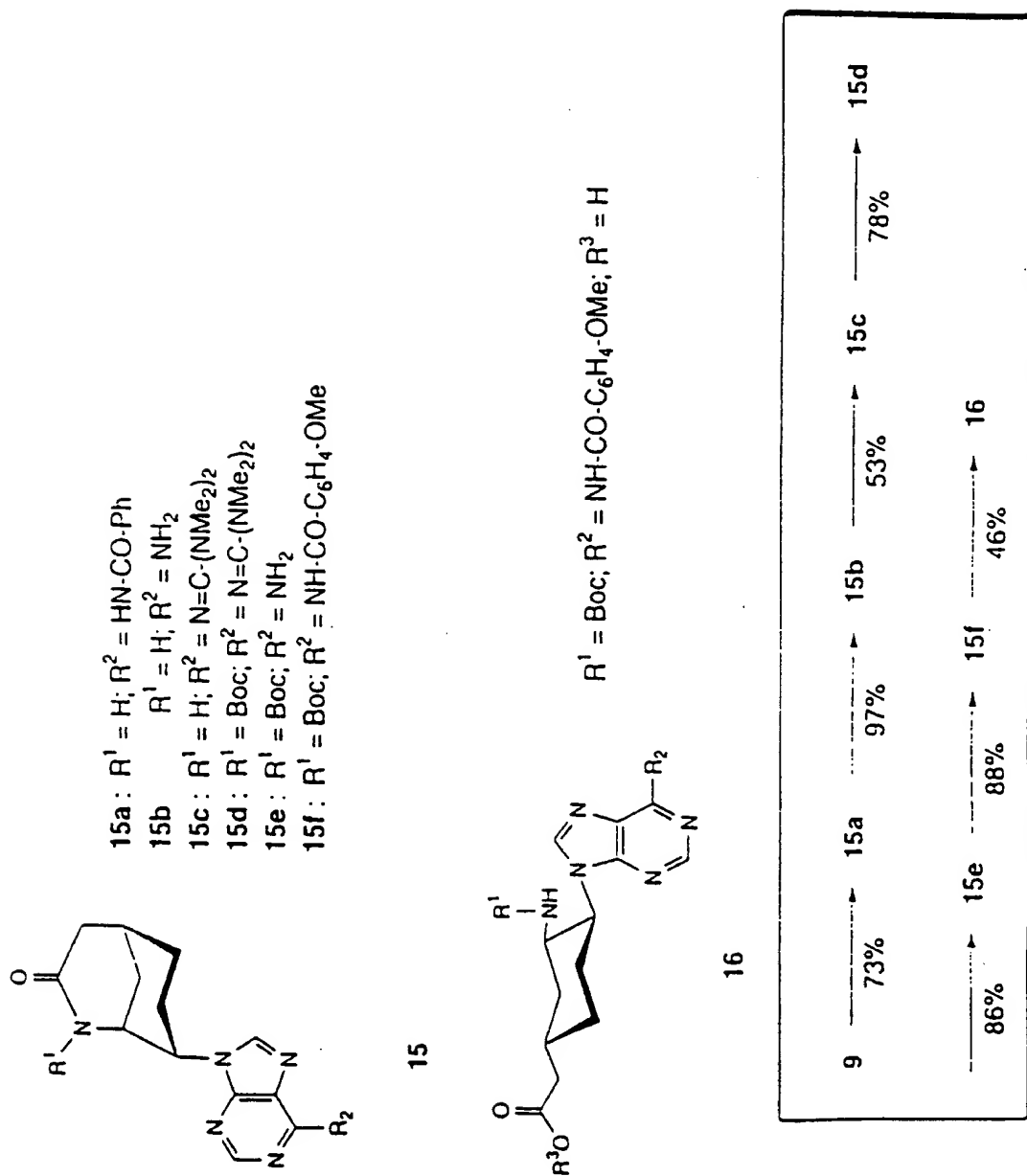


Fig. 2

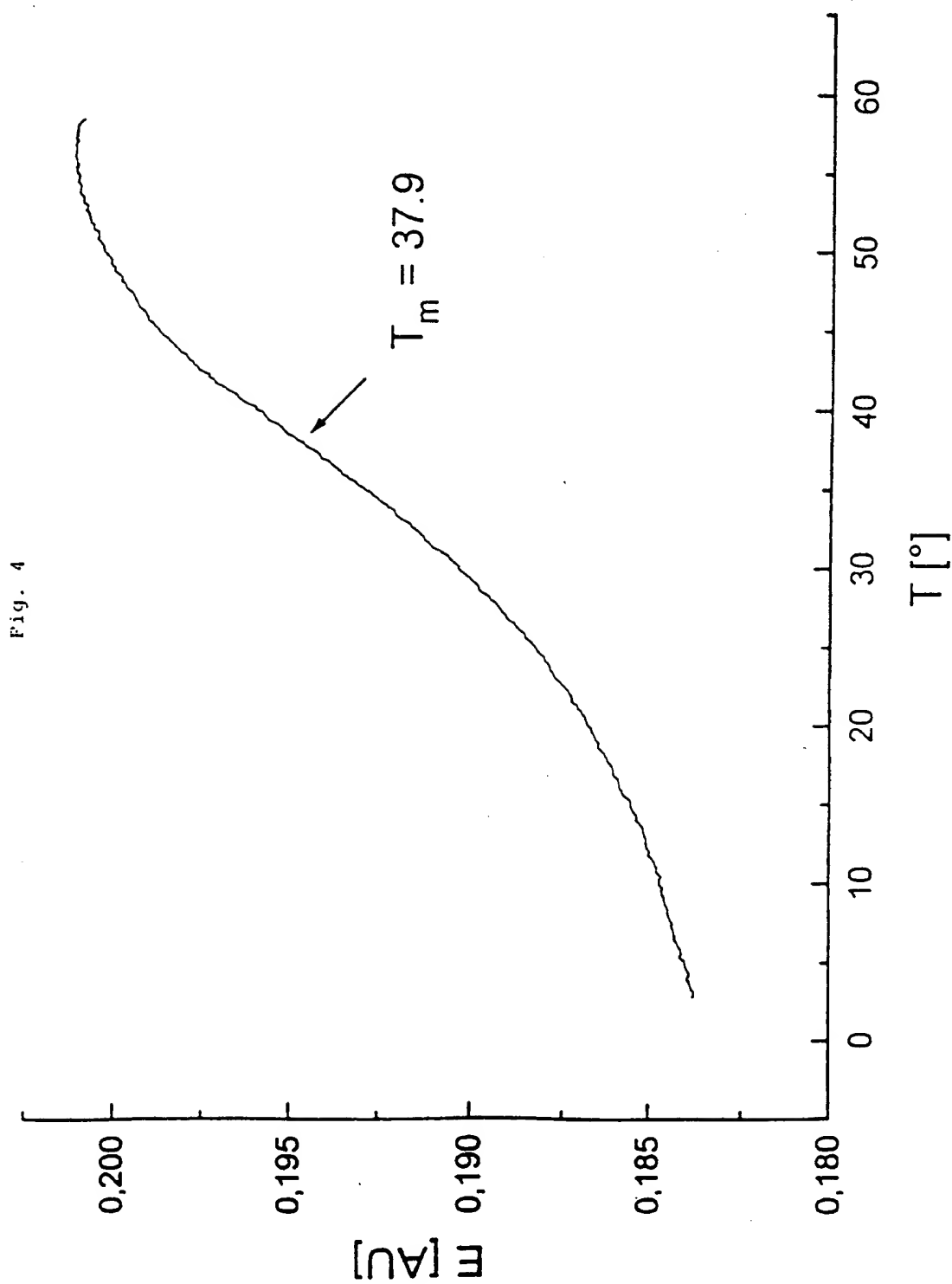


3/5

Fig. 3

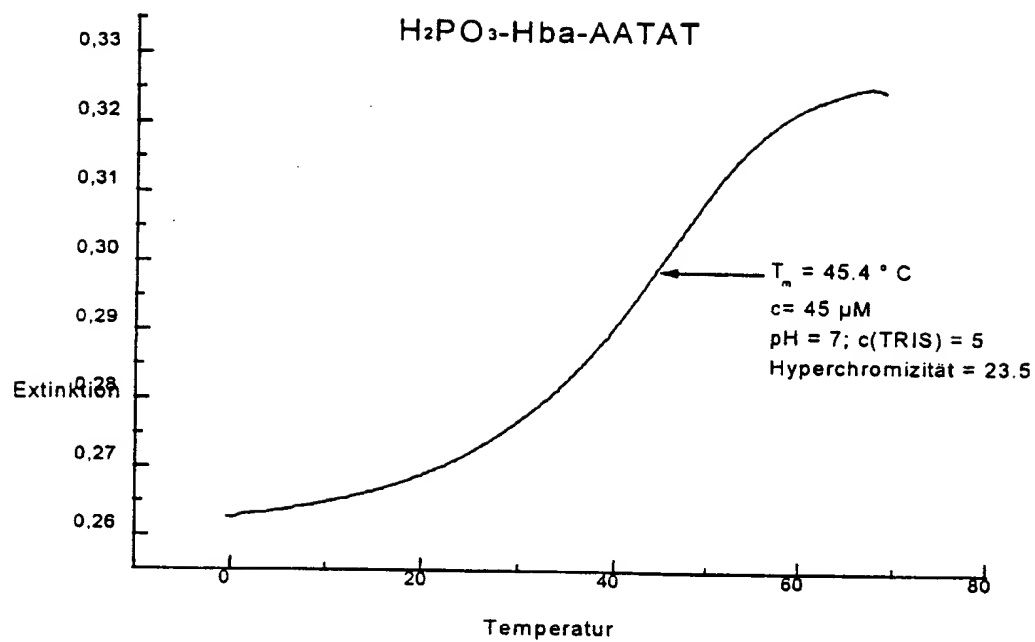


4/5



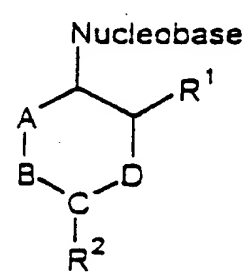
5/5

Fig. 5



**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  <b>C07D 239/54, 473/34, C07K 7/06, A61K 47/42, 47/48</b></p>	<b>A3</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/15509</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. April 1999 (01.04.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06002</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 21. September 1998 (21.09.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:          197 41 739.6      22. September 1997 (22.09.97)    DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVENTIS RESEARCH &amp; TECHNOLOGIES GMBH &amp; CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MICULKA, Christian [AT/DE]; Gebeschusstrasse 36, D-65929 Frankfurt am Main (DE). WINDHAB, Norbert [DE/DE]; Akazienstrasse 28, D-65759 Hattersheim (DE). ESCHENMOSER, Albert [CH/CH]; Bergstrasse 9, CH-8700 Küsnacht (CH). SCHERER, Stefan [DE/DE]; Lerchenweg 5, D-64572 Büttelborn (DE). QUINKERT, Gerhard [DE/DE]; Schauinsland 32, D-61479 Glashütten (DE).</p> <p>(74) Anwälte: BARDEHLE, Heinz usw.; Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 24. Juni 1999 (24.06.99)</p>	
<p>(54) Title: CYCLOHEXYL AND HETEROCYCLYL NUCLEOSIDE DERIVATIVES, METHOD FOR PRODUCING THESE DERIVATIVES, AND THE USE OF THE DERIVATIVES AND THEIR OLIGOMERS OR CONJUGATES IN PAIRING AND/OR TESTING SYSTEMS</p> <p>(54) Bezeichnung: CYCLOHEXYL- UND HETEROCYCLYL-NUKLEOSID DERIVATE, DIE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG DIESER DERIVATE, DEREN OLIGOMERE BZW. KONJUGATE IN PAARUNGS- UND/ODER TESTSYSTEMEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a compound of formula (I), wherein R<sup>1</sup> is NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, OR<sup>3</sup> or SR<sup>3</sup> with R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> being H or C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> independently of each other and being the same or different, n being a whole number from 1 to 12; R<sup>2</sup> is equal to C<sub>m</sub>H<sub>2m</sub>-C(X)-Y with X being =O, =S or =N, Y being equal to OR<sup>3</sup>, NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> or SR<sup>3</sup>, R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> having the same meaning given above, and m being a whole number from 1 to 4; or R<sup>2</sup> is equal to C<sub>m</sub>H<sub>2m</sub>-Z-Y' with Z being a sulfonyl, phosphonyl, ether or amine group, Y' being equal to H, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>, OR<sup>3</sup>, NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> or SR<sup>3</sup> then Z is sulphonyl or phosphonyl group, n, R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> having the meaning given above, and Y' being equal to C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> when Z is an ether or an amine group; A, B, and D are the same or different and mean CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, O, NR<sup>7</sup> ou S independently of each other with R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> and R<sup>7</sup> being H or C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>, independently of each other, n having the meaning given above; and C is equal to CR<sup>8</sup> or N with R<sup>8</sup> having the meaning of R<sup>5</sup> independently, A-B, B-C or C-D not being two identical heteroatoms; and nucleobase means thymine, uracile, adénine, cytosine, guanine, isocytosine, isoguanine, xanthine or hypoxanthine. The invention also relates to a method for producing these derivatives and to their use in pairing and/or testing systems.</p>		
<div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;">(I).</div> </div>		

### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Verbindung der Formel (I), worin  $R^1$  gleich  $NR^3R^4$ ,  $OR^3$  oder  $SR^3$  ist mit  $R^3$  und  $R^4$  unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, H oder  $C_nH_{2n+1}$ , wobei n gleich eine ganze Zahl von 1-12 ist;  $R^2$  gleich  $C_mH_{2m}-C(X)-Y$  mit X gleich  $=O$ ,  $=S$  oder  $=N$  ist; Y gleich  $OR^3$ ,  $NR^3R^4$  oder  $SR^3$  ist, wobei  $R^3$  und  $R^4$  die oben genannte Bedeutung haben; und m eine ganze Zahl von 1-4, oder  $R^2$  gleich  $C_mH_{2m}-Z-Y'$  ist mit Z gleich eine Sulfonyl-, Phosphonyl-, Ether- oder Amin-Gruppe, wobei, wenn Z gleich eine Sulfonyl- oder Phosphonyl-Gruppe, Y' gleich H,  $C_nH_{2n+1}$ ,  $OR^3$ ,  $NR^3R^4$  oder  $SR^3$  ist, wobei n,  $R^3$  und  $R^4$  die oben genannte Bedeutung haben, und, wenn Z gleich eine Ether- oder Amin-Gruppe, Y' gleich  $C_nH_{2n+1}$  ist; A, B und D unabhängig voneinander, gleich oder verschieden,  $CR^5R^6$ , O,  $NR^7$  oder S bedeuten mit  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  unabhängig voneinander H oder  $C_nH_{2n+1}$ , wobei n die oben genannte Bedeutung hat und C gleich  $CR^8$ , O,  $NR^7$  oder S bedeutet mit  $R^8$  unabhängig davon die Bedeutung von  $R^5$ , wobei jedoch A-B, B-C oder C-D nicht zwei gleiche Heteroatome bedeuten; und Nucleobase Thymin, Uracil, Adenin, Cytosin, Guanin, Isocytosin, Isoguanin, Xanthin oder Hypoxanthin bedeutet; ihre Herstellung und Verwendung in Paarungs- und/oder Testsystemen.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/06002

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07D239/54 C07D473/34 C07K7/06 A61K47/42 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 13121 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC.) 8 July 1993 see page 19; claims 39-48; example 6 ---	17-26
P,X	WO 97 43232 A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 20 November 1997 see claims 1-39; figures 3,4 ---	1-12,17, 18,23-26
P,X	WO 98 25943 A (HOECHST RESEARCH & TECHNOLOGY DEUTSCHLAND GMBH & CO. KG) 18 June 1998 see claims 1,2,12,17-22 --- -/-	17-26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 1999

Date of mailing of the international search report

19. 04. 99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

HARTRAMPF G.W.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No  
PCT/EP 98/06002

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SCHAEFFER H.J. &amp; VINCE R.: "Enzyme inhibitors. XIX. The synthesis of some 1-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-(6-substituted -9-purinyl)cyclohexanes as nucleoside analogs"</p> <p>JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 11, no. 1, January 1968, pages 15-20, XP002090866</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-9
Y	<p>PEREZ-PEREZ M.J. ET AL.: "Application of the Mitsunobu-type condensation reaction to the synthesis of phosphonate derivatives of cyclohexenyl and cyclohexanyl nucleosides"</p> <p>JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 60, no. 6, June 1995, pages 1531-1537, XP002090867</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-9
Y	<p>MIKHAILOV S.N. ET AL.: "Use of cyclohexene epoxides in the preparation of carbocyclic nucleosides"</p> <p>NUCLEOSIDES &amp; NUCLEOTIDES, vol. 15, no. 4, 1996, pages 867-878, XP002089763</p> <p>see compounds 4, schema 2</p> <p>see page 869</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-9
A	<p>MARQUEZ V.E. &amp; LIM M.I.: "Carbocyclic nucleosides"</p> <p>MEDICINAL RESEARCH REVIEWS, vol. 6, no. 1, 1986, pages 1-40, XP000607502</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-9
A	<p>BORTHWICK A.D. &amp; BIGGADIKE K.: "Synthesis of chiral carbocyclic nucleosides"</p> <p>TETRAHEDRON (REPORT NUMBER 305), vol. 48, no. 4, 24 January 1992, pages 571-623, XP000563919</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-9
A	<p>KNAPP S.: "Iodolactamization: Aspects and applications"</p> <p>ADVANCES IN HETEROCYCLIC NATURAL PRODUCT SYNTHESIS, vol. 3, 1996, pages 57-98, XP002090868</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	10-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 98/06002

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 1, 2 & 10 to 16  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
See supplemental sheet
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-3 (in part), 4, 5, 6-26 (in part)

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ EP 98/06002

Claim nos.: 1, 2 & 10 to 16 (in part)

The R2 radical in claim 1 is defined inter alia as a radical  $-(CH_2)_m-C(X)-Y$ , wherein X means  $=O$ ,  $=S$  or  $=N$ . However this does not cover the preferred definition of X as  $NR_3R_4$  and  $OR_3$  or  $NR_3R_4$  or  $NH_2$  in claims 1 and 2. The latter was therefore not taken into account in the search, see Article 6 PCT.

Claims 10, 13 and 14 relate to methods for producing compounds of formula (I) using an iodine cycloalkane. However, since the nucleobase can only be bonded to a (substituted) cyclohexyl- or 6-membered heterocyclyl radical, these claims go beyond the scope of the compounds defined by formula (I). Furthermore, claims 11, 12, 15 and 16 specify this iodine cycloalkane as iodine lactam; a definition which seems to be inadmissible from a chemical point of view, see Article 6 PCT. Claims 10 to 16 were therefore only searched to the extent that they relate to the production of the compounds in claim 1 (with the above restriction).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ EP 98 /06002

The International Searching Authority has established that this international application contains multiple (groups of) inventions as follows:

1. Claim nos.: 1-3 (in part), 4, 5, 6-26 (in part)

Compounds of formula (I), wherein the radicals A, B and D mean CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub> and the radical C means CR<sub>8</sub>, the production of said compounds, oligomers, conjugates and supports containing them and their use in pairing and/or testing systems.

2. Claim nos.: 1-3 and 6-26 (all in part)

Compounds of formula (I), wherein the radicals A, B C and D do not all simultaneously mean an optionally substituted carbon atom, the production of said compounds, oligomers, conjugates and supports containing them and their use in pairing and/or testing systems.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9313121 A	08-07-1993	AU 669353 B	06-06-1996
		AU 3427593 A	28-07-1993
		CA 2126691 A	08-07-1993
		EP 0618925 A	12-10-1994
		JP 6511155 T	15-12-1994
		US 5700922 A	23-12-1997
		US 5623065 A	22-04-1997
		US 5856455 A	05-01-1999
-----	-----	-----	-----
WO 9743232 A	20-11-1997	DE 19619373 A	20-11-1997
		AU 2895397 A	05-12-1997
-----	-----	-----	-----
WO 9825943 A	18-06-1998	DE 19651560 A	18-06-1998
		AU 5661298 A	03-07-1998
-----	-----	-----	-----

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06002

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07D239/54 C07D473/34 C07K7/06 A61K47/42 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 13121 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC.) 8. Juli 1993 siehe Seite 19; Ansprüche 39-48; Beispiel 6 ---	17-26
P,X	WO 97 43232 A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 20. November 1997 siehe Ansprüche 1-39; Abbildungen 3,4 ---	1-12,17, 18,23-26
P,X	WO 98 25943 A (HOECHST RESEARCH & TECHNOLOGY DEUTSCHLAND GMBH & CO. KG) 18. Juni 1998 siehe Ansprüche 1,2,12,17-22 ---	17-26
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Januar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19. 04. 99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

HARTRAMPF G.W.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06002

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	SCHAEFFER H.J. & VINCE R.: "Enzyme inhibitors. XIX. The synthesis of some 1-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-(6-substituted -9-purinyl)cyclohexanes as nucleoside analogs" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, Bd. 11, Nr. 1, Januar 1968, Seiten 15-20, XP002090866 siehe das ganze Dokument ---	1-9
Y	PEREZ-PEREZ M.J. ET AL.: "Application of the Mitsunobu-type condensation reaction to the synthesis of phosphonate derivatives of cyclohexenyl and cyclohexanyl nucleosides" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, Bd. 60, Nr. 6, Juni 1995, Seiten 1531-1537, XP002090867 siehe das ganze Dokument ---	1-9
Y	MIKHAILOV S.N. ET AL.: "Use of cyclohexene epoxides in the preparation of carbocyclic nucleosides" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, Bd. 15, Nr. 4, 1996, Seiten 867-878, XP002089763 siehe Verbindungen 4, Schema 2 siehe Seite 869 ---	1-9
A	MARQUEZ V.E. & LIM M.I.: "Carbocyclic nucleosides" MEDICINAL RESEARCH REVIEWS, Bd. 6, Nr. 1, 1986, Seiten 1-40, XP000607502 ---	1-9
A	BORTHWICK A.D. & BIGGADIKE K.: "Synthesis of chiral carbocyclic nucleosides" TETRAHEDRON (REPORT NUMBER 305), Bd. 48, Nr. 4, 24. Januar 1992, Seiten 571-623, XP000563919 ---	1-9
A	KNAPP S.: "Iodolactamization: Aspects and applications" ADVANCES IN HETEROCYCLIC NATURAL PRODUCT SYNTHESIS, Bd. 3, 1996, Seiten 57-98, XP002090868 -----	10-16

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06002

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr. 1,2 & 10 to 16  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
Siehe Zusatzblatt
  
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

Siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1 - 3 (teilweise), 4, 5, 6 - 26 (teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Ansprüche Nr.: 1, 2 und 10 bis 16 (teilweise)

Der Rest R2 in Anspruch 1 ist unter anderem als Rest  $-(CH_2)_m-C(X)-Y$  definiert, worin X =O, =S oder =N bedeutet. Allerdings wird hiervon die vorzugsweise Definition von X als NR3R4 und OR3, oder NR3R4 oder NH2 in den Ansprüchen 1 und 2 nicht umfasst, die daher bei der Recherche nicht berücksichtigt wurde, siehe Artikel 6 PCT.

Ansprüche 10, 13 und 14 sind auf Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel (I) unter Verwendung von einem Jodcycloalkan gerichtet. Da die Nucleobase jedoch nur an einen (substituierten) Cyclohexyl- bzw. 6-gliedrigen Heterocyclylrest gebunden sein kann gehen diese Ansprüche über den Umfang der von Formel (I) definierten Verbindungen hinaus. Desweiteren spezifizieren die Ansprüche 11, 12, 15 und 16 dieses Jodcycloalkan als Jodlactam, eine Definition die chemisch nicht zulässig erscheint, siehe Artikel 6 PCT. Ansprüche 10 bis 16 wurden daher nur in dem Masse recherchiert insoweit sie die Herstellung von Verbindungen des Anspruchs 1 (mit obiger Einschränkung) betreffen.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-3 (teilweise), 4, 5, 6-26 (teilweise)

Verbindungen der Formel (I) worin die Reste A, B und D CR5R6 und der Rest C CR8 bedeuten, deren Herstellung, Oligomere, Konjugate und Träger die sie enthalten, und deren Verwendung in einem Paarungs- und/oder Testsystem

2. Ansprüche: 1-3 und 6-26 (alle teilweise)

Verbindungen der Formel (I) worin die Reste A, B, C und D nicht alle gleichzeitig ein eventuell substituiertes Kohlenstoffatom bedeuten, deren Herstellung, Oligomere, Konjugate und Träger die sie enthalten, und deren Verwendung in einem Paarungs- und/oder Testsystem



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06002

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9313121 A	08-07-1993	AU 669353 B	06-06-1996
		AU 3427593 A	28-07-1993
		CA 2126691 A	08-07-1993
		EP 0618925 A	12-10-1994
		JP 6511155 T	15-12-1994
		US 5700922 A	23-12-1997
		US 5623065 A	22-04-1997
		US 5856455 A	05-01-1999
WO 9743232 A	20-11-1997	DE 19619373 A	20-11-1997
		AU 2895397 A	05-12-1997
WO 9825943 A	18-06-1998	DE 19651560 A	18-06-1998
		AU 5661298 A	03-07-1998